



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

TESIS
**DETECCION DE MUTACIONES *KDR* EN POBLACIONES DE *Aedes*
Aegypti Y *Aedes albopictus*, PROCEDENTES DE LA REGION
METROPOLITANA DE PANAMA**

AUTORA
OSIRIS D MURCIA C

ASESORA
DRA ANAYANSI VALDERRAMA

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR EL
TITULO DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS CON ORIENTACION EN
BIOLOGIA MOLECULAR

PANAMA REPUBLICA DE PANAMA

2017



Título de la Tesis:

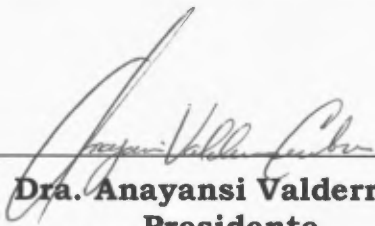
“Detección de mutaciones *kdr* en poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, procedentes de la Región Metropolitana de Panamá”

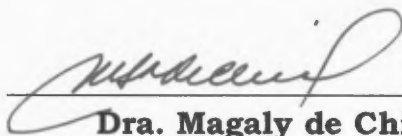
TESIS

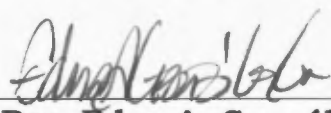
Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas con orientación en
Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

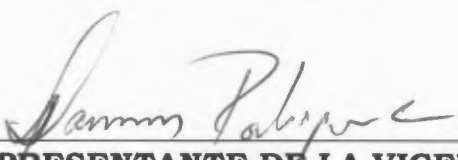
APROBADO POR:


Dra. Anayansi Valderrama
Presidente


Dra. Magaly de Chial
Miembro


Dra. Edna A. González
Miembro

REFRENDADO POR:


**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

DEDICATORIA

Con amor a mis padres Luis Murcia y Vielka de Murcia, por celebrar mis triunfos y fortalecerme en los momentos difíciles, por impulsarme a alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por concederme el regalo de la vida, la fe y la confianza para salir adelante.

A la Doctora Anayansi Valderrama, Jefa Encargada del Departamento de Investigación en Entomología Médica (DIEM) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), por su valiosa ayuda al dirigir esta investigación, por los conocimientos impartidos y su dedicación.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por financiar mis estudios de Maestría.

Al cuerpo docente del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad de Panamá (UP), por contribuir con mi formación académica.

A los miembros del Comité asesor, profesoras Dra. Magaly Sánchez de Chial y Dra. Edna Amada González, por invertir parte de su tiempo en la revisión del manuscrito final de la tesis.

Al Departamento de Control de Vectores del Ministerio de Salud, particularmente al Lic. Galindo Ruíz y al Lic. José Lasso, por su valiosa colaboración.

Al Dr. Enrique Medianero, por el respaldo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de Maestría, por la amistad y respaldo recibido durante estos casi tres años de estudios.

A mis amigos del Departamento de Investigación en Entomología Médica, gracias por su valioso apoyo y sobre todo su amistad.

A mis hermanos, Jorge, Luis Carlos y Lenin, por siempre brindarme su incondicional respaldo.

A todos los que directa e indirectamente contribuyeron con la realización de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	
Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO I	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	7
1. Los mosquitos como transmisores de enfermedades a los humanos	7
1.1. Generalidades de las especies <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	8
1.2. Distribución global y local de las especies <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	9
1.3. Impacto mundial y local de las arbovirosis transmitidas por las especies <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	12
2. Estrategias para el control de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	15

2.1. Eliminación de criaderos de larvas	15
2.2. Control mediante la aplicación de insecticidas químicos	16
2.2.1. Clasificación de los insecticidas químicos	17
a. Organoclorados	17
b. Organofosforados	18
c. Carbamatos	19
d. Piretroides	20
2.3. Control biológico	21
2.4. Control mediante herramientas genéticas	22
3. Control de las poblaciones de <i>Aedes</i> en Panamá	23
3.1. Vigilancia entomológica y control de los vectores.....	27
4. Resistencia frente a insecticidas	30
5. Proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje	33
5.1. Estructura de la Proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje.....	33
5.2. Gen de la Proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje	35
5.3. Funcionamiento del Canal de Sodio Dependiente de Voltaje	36
5.4. Efecto de los insecticidas en los Canales de Sodio Dependientes de Voltaje	37
6. Desarrollo de la Resistencia Knockdown en insectos	38
6.1. Estudios sobre la Resistencia Knockdown en poblaciones de <i>Aedes</i>	38
6.2. Impacto de la resistencia en el control de mosquitos vectores	39
CAPÍTULO II	
METODOLOGÍA	42
1. Muestreo	42

1.1. Población de estudio	42
1.2. Descripción de los sitios de colecta	42
1.3. Método para la captura de mosquitos	46
a. Ovitrapas Trap-N-Kill™	46
b. Trampas BG-Sentinel®	47
1.4. Temporalidad del muestreo	48
2. Procesamiento de muestras en el laboratorio	48
2.1. Identificación taxonómica	48
2.2. Aislamiento de ADN	49
2.3. Amplificación de fragmentos del gen del CSDV	50
2.4. Secuenciación	51
2.5. Análisis de resultados	52
CAPÍTULO III	
RESULTADOS	54
CAPÍTULO IV	
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA CITADA	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1.....	52
Oligonucleótidos utilizados para la identificación de la mutación <i>kdr</i> en muestras de ADN de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> .	
CUADRO 2.....	54
Mutaciones <i>kdr</i> detectadas en las muestras de <i>Aedes</i> spp.	
CUADRO 3.....	55
Composición nucleotídica porcentual de las secuencias del CSDV en las muestras de <i>Aedes</i> spp.	
CUADRO 4.....	59
Número de muestras de <i>Aedes</i> spp. con mutaciones <i>kdr</i> , según localidad de procedencia.	

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	8
Morfología externa de los vectores <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus) y <i>Aedes albopictus</i> (Skuse)	
FIGURA 2	10
Distribución global de <i>Ae aegypti</i>	
FIGURA 3	11
Distribución global de <i>Ae albopictus</i>	
FIGURA 4	18
Estructura bidimensional del DDT insecticida organoclorado	
FIGURA 5	19
Estructura bidimensional del insecticida organofosforado temefos	
FIGURA 6	19
Estructura bidimensional de los insecticidas carbamatos	
FIGURA 7	21
Estructura bidimensional de la deltametrina insecticida piretroide	

FIGURA 8.....	25
Línea de tiempo del uso de insecticidas químicos aplicados para el control de las poblaciones de <i>Aedes</i> spp. en Panamá.	
FIGURA 9.....	34
Representación esquemática de la subunidad α de la proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje (CSDV).	
FIGURA 10.....	45
Imagen satelital que señala las localidades de muestreo de las cuales provienen las muestras de mosquitos empleadas en la investigación.	
FIGURA 11.....	47
Ovitrapa Trap-N-Kill™ (Mosquito Science™, Estados Unidos) empleada para la captura de huevos de <i>Aedes</i> spp.	
FIGURA 12.....	48
Trampa BG-Sentinel® (Biogents, Alemania) empleada para la captura de especímenes adultos de <i>Aedes</i> spp.	
FIGURA 13.....	57
Sección parcial de la secuencia de nucleótidos del DIIS6 del gen <i>para</i> en <i>Ae. aegypti</i> (exón 20).	

Seccion parcial de la secuencia de nucleotidos del DIIS6 del gen *para* en *Ae aegypti*
(exon 21)

ABREVIATURAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Herramienta de búsqueda de alineación local básica)
CHIKV	Virus Chikungunya
CSDV	Canal de Sodio Dependiente de Voltaje
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DEKA	Motivo Ácido aspártico Ácido glutámico Lisina Alanina
DENV	Virus del Dengue
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
IFM	Motivo Isoleucina Fenilalanina Metionina
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censo
IRAC	<i>Insecticide Resistance Action Committee</i> (Comité de Acción para la Resistencia de los Insecticidas)
Kdr	<i>Knock down resistance</i>
MFV	Motivo Metionina Fenilalanina Metionina
MINSA	Ministerio de Salud
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
OF	Organofosforados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

PCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa
PCR AS	Reaccion en Cadena de la Polimerasa Alelo Especifica
PI	Piretroide
RIDL	<i>Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene</i> (Liberacion de insectos que portan un gen letal dominante)
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i> (Tecnica de insectos esteriles)
WHO	<i>World Health Organization</i>
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla
ZIKV	Virus del Zika

RESUMEN

En Panamá, arbovirosis como el Dengue y más recientemente la fiebre Chikungunya y la enfermedad por Zika, constituyen un problema de salud pública prioritario. El control de los vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* sigue siendo la principal estrategia para reducir los índices de transmisión de estas enfermedades; actualmente, las actividades de control que desarrolla el Departamento de Control de Vectores del Ministerio de Salud se sustentan en la eliminación de los criaderos de larvas y en el uso de insecticidas de tipo piretroide.

Sin embargo, una de las principales problemáticas que enfrentan los programas de control con insecticidas es el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las poblaciones de vectores. La resistencia knockdown o *kdr*, ampliamente documentada en poblaciones de *Ae. aegypti* y de *Ae. albopictus*, es causada por mutaciones puntuales que ocurren a nivel del gen del Canal de Sodio Dependiente de Voltaje (CSDV), sitio de unión de los insecticidas piretroides.

El principal objetivo de esta investigación fue evaluar la presencia de mutaciones *kdr* en muestras de mosquitos *Aedes* procedentes de diferentes localidades de la región Metropolitana de Panamá. A través de la amplificación por PCR de segmentos parciales del gen del CSDV y su posterior secuenciación, se pudo detectar mutaciones *kdr* relacionadas con la resistencia frente a insecticidas piretroides.

Los resultados obtenidos brindan un panorama general del estado de las poblaciones de *Aedes* con respecto a la resistencia *kdr*. Esta información tiene gran relevancia para las actividades que realiza el Programa de Control del *Aedes* en Panamá, ya que constituye un abordaje factible para la detección oportuna de la resistencia, así como para el desarrollo de estrategias que contrarresten tal problemática. Indirectamente, contribuye con la reducción de los costos implicados en el manejo de las arbovirosis transmitidas por este vector.

SUMMARY

In Panama, arbovirosis such as Dengue fever and, more recently, Chikungunya fever and Zika disease, are a priority public health problem. Control of the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* vectors remains the main strategy to reduce the transmission rates of these diseases. At present, the control activities developed by the Department of Vector Control of the Ministry of Health are based on the elimination of larval breeding sites and the use of pyrethroid insecticides.

However, one of the major issues facing insecticide control programs is the development of resistance mechanisms by vector populations. Knockdown resistance or *kdr*, widely documented in *Ae. aegypti* and *Ae. Albopictus*, is caused by point mutations occurring at the Voltage Dependent Sodium Channel (CSDV) gene, the site of attachment of pyrethroid insecticides.

The main objective of this research was to evaluate the presence of *kdr* mutations in samples of *Aedes* mosquitoes from different locations in the metropolitan region of Panama. Through PCR amplification of partial segments of the CSDV gene and its subsequent sequencing, it was possible to detect *kdr* mutations related to resistance against pyrethroid insecticides.

Results obtained provide an overview of the *Aedes* populations situation with respect to *kdr* resistance. This information has great relevance to the activities carried out by the *Aedes* Control Program in Panama, since it constitutes a feasible approach for the timely detection of resistance as well as for the development of strategies that counteract this problem. Indirectly contributing to the reduction of the costs involved in the management of arboviruses transmitted by this vector.

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (Linnaeus) y *Aedes albopictus* (Skuse), son dos de las especies de mosquitos más importantes en lo que se refiere a transmisión de enfermedades infecciosas (Figueroa *et al.*, 2015; Rey & Lounibos, 2015). Son vectores de diferentes arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) de relevancia mundial que incluyen el virus del Dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus del Zika (ZIKV) (Kraemer *et al.*, 2015). Ambas especies de Dípteros son consideradas invasoras, ya que han manifestado éxito al colonizar muchas regiones fuera de sus áreas endémicas (Rey & Lounibos, 2015).

Durante las últimas décadas el número de epidemias arbovirales ha manifestado un aumento. En muchos casos las enfermedades arbovirales emergentes y reemergentes han sido causadas por virus considerados controlados o de poca importancia, pero la introducción de éstos a nuevas áreas geográficas ha contribuido a la aparición de brotes importantes (Contigiani *et al.*, 2017; Mayer *et al.*, 2017).

En Panamá, las enfermedades transmitidas por *Aedes* constituyen un problema de salud pública. Según datos epidemiológicos del MINSA, a mediados de abril del 2016 los casos confirmados de Dengue ascendían a 412 y hasta mediados de mayo del mismo año,

se presentó un acumulado de 272 casos confirmados de infección por Zika y 11 casos de fiebre Chikungunya (MINSA, 2016a, 2016b, 2016c).

La principal estrategia para controlar, interrumpir y prevenir la transmisión de arbovirosis como el Dengue, está enfocada en controlar la densidad de las poblaciones de los vectores (Huang *et al.*, 2017; Karunamoorthi & Sabesan, 2013); dicho control se da primordialmente a través del uso de insecticidas químicos (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2014). No obstante, los programas de control de vectores se enfrentan a la problemática del desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las poblaciones de los vectores (David *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016).

La resistencia knockdown o *kdr*, por ejemplo, es uno de los principales tipos de resistencia frente a insecticidas piretroides (Aguirre-Obando *et al.*, 2015); es causada por mutaciones puntuales a nivel de la secuencia de nucleótidos del gen *para* y conduce a cambios en algunos aminoácidos de la proteína CSDV, lo que provoca una reducción de la unión con el insecticida y por consiguiente pérdida del efecto del mismo (Alvarez *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2014; Donnelly *et al.*, 2009; Hemingway & Ranson, 2000).

Considerando el panorama epidemiológico de Panamá con respecto a las arbovirosis Dengue, fiebre Chikungunya y enfermedad por Zika, así como los elevados niveles de infestación de los vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, se planteó a través de esta investigación evaluar mediante herramientas moleculares la presencia de mutaciones *kdr*, en muestras de *Aedes* procedentes de diferentes localidades de la región Metropolitana

del país.

El monitoreo de las poblaciones de los vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* es de suma importancia en el abordaje de las arbovirosis mencionadas, por ende, la información generada en esta investigación tiene especial relevancia para las actividades de control vectorial aplicadas actualmente en el país, ya que permitirá tener un panorama general sobre el estado de las poblaciones de *Aedes* con respecto a la resistencia *kdr*.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar mutaciones asociadas a la resistencia *kdr*, en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* procedentes de diferentes localidades de la región Metropolitana de Panamá.

Objetivos Específicos:

1. Identificar las mutaciones *kdr* en los sitios Ser989, Ile1011, Leu1014, Val1016 y Phe1534 en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.
2. Calcular las frecuencias de las mutaciones *kdr* presentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* contempladas en el estudio.
3. Comparar las frecuencias de las mutaciones *kdr* entre las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en base a la localidad de la cual proceden las muestras.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. Los mosquitos transmisores de enfermedades a los humanos

Los vectores son organismos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas. Muchos de los vectores son insectos hematófagos, que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado (persona o animal) y que posteriormente los inoculan a un nuevo portador; anualmente más de mil millones de personas son afectadas por enfermedades transmitidas por vectores y más de un millón mueren por esta misma causa (WHO, 2014).

La importancia médica de los mosquitos (Diptera: Culicidae) es conocida a nivel mundial ya que son vectores de numerosos patógenos humanos como virus, protozoos, filarias, entre otros. De las enfermedades transmitidas por mosquitos tenemos la Fiebre Amarilla, el Dengue, Dengue Hemorrágico (actualmente conocido como Dengue Severo), Malaria, Encefalitis Equinas, Chikungunya y Zika, que son arbovirosis con un alto impacto en la salud pública (Figuerola *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016).

Con la introducción de insecticidas sintéticos en los años 1940 y 1950, muchas regiones a nivel mundial percibieron una disminución en la prevalencia de las enfermedades

transmitidas por mosquitos vectores; sin embargo, la incidencia de éstas actualmente se mantiene en aumento y muestra de ello, es la pandemia mundial de enfermedades tales como el Dengue (Smith *et al.*, 2016).

1.1. Generalidades de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Aedes aegypti (Linnaeus) y *Aedes albopictus* (Skuse) (Fig. 1), son dos de las especies de mosquitos más importantes en lo que se refiere a transmisión de enfermedades infecciosas (Figueroa *et al.*, 2015; Rey & Lounibos, 2015). Son vectores de diferentes arbovirus de relevancia mundial incluyendo el virus del Dengue (DENV), el virus de la Fiebre Amarilla (YFV), el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus del Zika (ZIKV) (Kraemer *et al.*, 2015). Ambas son consideradas especies invasoras, ya que han manifestado éxito al colonizar muchas regiones fuera de sus áreas endémicas (Rey & Lounibos, 2015).



Fig. 1. Morfología externa de los vectores *Aedes aegypti* (Linnaeus) - izquierda - y *Aedes albopictus* (Skuse) - derecha. Florida Medical Entomology Laboratory. *Essential Information on the ZIKA Virus* [Imagen en línea]. Recuperado el 3 de mayo, 2017, de: http://fmel.ifas.ufl.edu/media/fmelifasufl.edu/images/aegypti_albo3-1035x613.jpg.

Considerado el principal vector del DENV, *Ae. aegypti* es una especie común en hábitats urbanos, que tiene la particularidad de depositar sus huevos en cualquier estructura u objeto que almacene agua, lo que facilita su cohabitación con los humanos (Smith *et al.*, 2016; WHO, 2014). Es una especie de hábitos diurnos que muestra períodos de alimentación máxima durante las primeras horas de la mañana y durante el atardecer. La hembra requiere alimentarse de sangre para el desarrollo de los huevos y preferentemente lo hace de sangre humana (Gonzales *et al.*, 2015; Powell & Tabachnick, 2013; Scott & Takken, 2012; Smith *et al.*, 2016).

Ae. albopictus también es una especie con hábitos de alimentación diurna, pero usualmente exofágica, ya que dependiendo de la disponibilidad y condiciones ambientales puede llegar a morder tanto a humanos como animales (Bonizzoni *et al.*, 2013; Paupy *et al.*, 2009). Debido a que ésta especie tiene la capacidad de colonizar diferentes nichos ecológicos, sobrevivir tanto a temperaturas templadas como a condiciones de desecación, prosperar tanto en entornos rurales como semi-urbanos y con esto ampliar la gama de especies hospederas, constituye un riesgo preocupante para la salud humana (Bonizzoni *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016; WHO, 2014).

1.2. Distribución global y local de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Ae. aegypti es una especie endémica de África que se introdujo en el Nuevo Mundo gracias a la movilización de embarcaciones marítimas, consecuentemente se distribuyó a nivel mundial hacia regiones tropicales y subtropicales (Brown *et al.*, 2014; Powell & Tabachnick, 2013). Actualmente se encuentra en Centro y Sur América, la parte sur de

América del Norte, Oriente Medio, el Sudeste de Asia, el Pacífico e Islas de la India, el norte de Australia y esporádicamente en Europa (Fig. 2) (Kraemer *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016).



Fig. 2 Distribución global de *Ae. aegypti*. El mapa representa la probabilidad de ocurrencia (0 = azul y 1 = rojo) en una distribución de 5 km x 5 km. (Kraemer *et al.*, 2015).

En tanto *Ae. albopictus*, originalmente endémico del sudeste de Asia, se extendió a nivel mundial incluyendo las islas del Pacífico, las Américas, varios países de Europa y África (Fig. 3), a través del comercio de neumáticos usados y de otros productos tales como plantas decorativas (Bonizzoni *et al.*, 2013; Kraemer *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016).



Fig. 3 Distribución global de *Ae. albopictus*. El mapa representa la probabilidad de ocurrencia (0 = azul y 1 = rojo) en una distribución de 5 km x 5km. (Kraemer *et al.*, 2015).

Rey & Lounibos (2015) resaltan que en un inicio se pensó que la expansión geográfica de *Ae. albopictus* estaba acompañada por la disminución en la abundancia de *Ae. aegypti* o incluso por su eliminación local, fenómeno aparentemente asociado con la competencia entre las dos especies; sin embargo, actualmente las dos coexisten en extensas regiones de América.

La llegada de *Ae. aegypti* a Panamá, al igual que en el resto de los países de América, pudo haber ocurrido durante la época colonial (Powell & Tabachnick, 2013). En la actualidad, *Ae. aegypti* se encuentra distribuido prácticamente en todo el territorio nacional, con excepción de la Comarca Ngäbe Buglé (J. Lasso, comunicación personal, 29 de mayo de 2017).

A diferencia de *Ae. aegypti*, el establecimiento de las poblaciones de *Ae. albopictus* es

reciente fue detectado por primera vez en el 2002 en un area urbana de la region Metropolitana y a partir de ese año ha manifestado un incremento en su abundancia (Futami *et al* 2015) Entre el 2002 y 2005 *Ae albopictus* solo se encontro en la porcion este de la ciudad de Panama entre el 2006 y 2009 la densidad de mosquitos incremento en la ciudad de Panama expandiendose a Colon y entre el 2010 y 2013 se expandio tanto para el area este de la ciudad de Panama y hacia el oeste de la provincia de Panama entre Santiago de Veraguas y la frontera de nuestro pais con Costa Rica (Miller & Loaiza, 2015)

Actualmente *Ae albopictus* tiene una distribucion bastante generalizada en el territorio nacional segun los resultados de la encuesta entomologica del Ministerio de Salud correspondiente al primer trimestre de este año las unicas Regiones de Salud donde no se ha ubicado el vector son Bocas del Toro Comarca Guna Yala y Darien (J Lasso comunicacion personal 29 de mayo de 2017)

1.3 Impacto mundial y local de las arbovirosis transmitidas por las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Los arbovirus representan una amenaza de salud sustancial tanto para los seres humanos como para algunas especies de animales causando una variedad de manifestaciones clinicas que van desde leves hasta sintomas que pueden amenazar la vida (Mayer *et al* 2017) Durante las ultimas decadas el numero de epidemias arbovirales ha manifestado un aumento En muchos casos las enfermedades arbovirales emergentes y reemergentes han sido causadas por virus considerados controlados o de poca importancia pero la

introduccion de estos a nuevas areas geograficas ha contribuido a la aparicion de brotes importantes (Contigiani *et al* 2017 Mayer *et al* 2017)

Se estima que el Dengue constituye un riesgo para más del 40% de la poblacion mundial y que por año se presentan de 50 a 100 millones de infecciones a causa de este virus tambien alrededor de 500 mil personas con Dengue requieren hospitalizacion cada año de la cual una gran proporcion son infantes y acerca del 2.5% de los individuos afectados fallecen (Bhatt *et al* 2013 WHO 2014)

La Fiebre Amarilla, como el Dengue es una fiebre hemorrágica que puede ser letal si no se maneja correctamente y a pesar de la existencia de una vacuna preventiva todavia se presentan unos 200 mil casos y 30 mil muertes a nivel mundial cada año El numero de casos de Fiebre Amarilla ha aumentado en las dos ultimas decadas debido a la disminucion de la inmunidad en la población humana frente a la infeccion los movimientos poblacionales la deforestacion la urbanizacion y el cambio climatico (WHO 2014)

Recientemente la fiebre Chikungunya se ha convertido en un problema de salud publica debido a que el CHIKV ha manifestado epidemias explosivas con impacto de escala global reportado en alrededor de 40 paises este virus ha sido listado como un patogeno prioritario de categoria C por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos (Sanyaolu *et al* 2016)

En tanto la enfermedad por Zika, ha generado una gran preocupacion para la salud humana desde su llegada a las Americas en el 2014 debido a su asociacion con trastornos neurologicos como la microcefalia y el sindrome de Guillain Barre (Gatherer & Kohl 2016 Grard *et al* 2014 Smith *et al* 2016) El ZIKV ha causado grandes epidemias en el Pacifico (en la Isla de Yap en el 2007 y en la Polinesia Francesa entre el 2012 al 2014) Los brotes importantes subsiguientes en Centro y Sur America entre el 2015 y el 2016 llevaron a la Organizacion Mundial de la Salud a declarar tal situacion como estado de emergencia de salud publica internacional (Boeuf *et al* 2016)

En Panama, como en otras regiones tropicales las enfermedades transmitidas por *Aedes* constituyen un problema de salud publica Segun datos epidemiologicos del MINSA a mediados de abril del 2016 los casos de Dengue confirmados ascendian a 412 siendo la region de salud Metropolitana la mas afectada Producto del brote de Zika iniciado en el 2015 hasta mayo del 2016 se presento un acumulado de 272 casos confirmados de infeccion por Zika, 16 de los cuales correspondian a mujeres embarazadas Se registraron tres casos de microcefalia y un caso de obito fetal con resultado positivo para Zika, asi como tres casos de Sindrome Guillain Barre relacionados con Zika En cuanto a la fiebre Chikungunya, hasta mediados de mayo de 2016 se presentaron 11 casos seis de los cuales correspondian a casos autoctonos es decir adquiridos localmente (MINSA 2016a, 2016b 2016c)

2 0 Estrategias para el control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

En las ultimas decadas se han logrado avances significativos en el desarrollo de terapias y vacunas para muchos de los patogenos transmitidos por mosquitos sin embargo la principal estrategia para controlar interrumpir y prevenir la transmision de diversas arbovirosis esta enfocada en controlar la densidad de las poblaciones de los vectores (Huang *et al* 2017 Karunamoorthi & Sabesan 2013)

Las estrategias de control vectorial pueden clasificarse en cuatro categorias eliminacion de criaderos de larvas uso de insecticidas quimicos control biologico y uso de herramientas geneticas (Bonizzoni *et al* 2013) Segun la WHO (2014) el exito en el control de vectores es posible lograrlo por medio de un enfoque integrado adaptado a los entornos locales y a las condiciones socioeconomicas de cada localidad De las estrategias mencionadas el manejo del habitat de los mosquitos por medio de la eliminacion de los criaderos de larvas y el uso de insecticidas son las que se emplean de forma generalizada a nivel mundial (Bhatt *et al* 2013 WHO 2014)

2 1 Eliminacion de criaderos de larvas

La adopcion de mallas para ventanas de las viviendas y la limpieza de envases o contenedores de agua que podrian convertirse en sitios de reproduccion para los vectores son medidas efectivas para reducir las poblaciones larvales de *Aedes* y el impacto de las arbovirosis (WHO 2014) Un ejemplo de ello es la campaña de reduccion de fuentes de criaderos de *Ae aegypti* realizada en Brasil en la misma quedo comprobada la efectividad del uso de redes de nylon en la reduccion de la densidad de

mosquitos al ser utilizadas para cubrir los tanques de agua y los tambores de metal identificados como los sitios de reproducción mas efectivos para el vector (Maciel de Freitas & Lourenço de Oliveira, 2011)

2.2 Control mediante la aplicación de insecticidas químicos

La intervención química común con insecticidas incluye el tratamiento de criaderos de larvas la pulverización residual de interiores y pulverización espacial (nebulización) cuyo blanco son los individuos adultos epidemiológicamente el estadio de vida mas relevante (van den Berg *et al* 2012 Vontas *et al* 2012 WHO 2006)

La elección del modo de aplicación del insecticida depende en gran medida del comportamiento del mosquito para especies de hábitos diurnos como *Ae aegypti* y *Ae albopictus* se emplean la nebulización y los larvicidas cuya aplicación es logísticamente desafiante tanto para áreas urbanas como rurales económicamente costosa y en muchos casos de eficacia inestable (David *et al* 2013 McGraw & O'Neill 2013)

Los insecticidas han mostrado ser útiles en el control de mosquitos vectores debido a su acción relativamente rápida, manifestando un éxito bastante notable en la lucha de especies como *Ae aegypti* por ejemplo para el año 1972 este vector había sido erradicado del 73% de la superficie terrestre pero consecuentemente se reconoció la problemática del desarrollo de resistencia frente al insecticida dicloro difenil tricloroetano o DDT empleado para su control (Smith *et al* 2016)

2.2.1 Clasificación de los insecticidas químicos

Existen cuatro tipos de insecticidas comunes empleados para el control de los mosquitos adultos de *Aedes*: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. De estos, los piretroides (deltametrina y permetrina) así como los organofosforados (malation, fenitrothion y pirimifos metil) son ampliamente utilizados para el control de las poblaciones de estos mosquitos a nivel mundial (David *et al.* 2013, van den Berg *et al.* 2012, WHO 2006), particularmente en respuesta a situaciones prioritarias como brotes epidémicos o cuando el número de mosquitos es elevado (Vontas *et al.* 2012).

A continuación se resaltan las características y modos de acción de los diferentes tipos de insecticidas.

a Organoclorados

Compuestos orgánicos con cinco o más átomos de cloro en su estructura (hidrocarburos clorados) (Fig. 4) representan uno de los primeros grupos de insecticidas sintéticos en utilizarse para el control de un amplio rango de insectos de importancia agrícola y médica (Eldridge 2008).

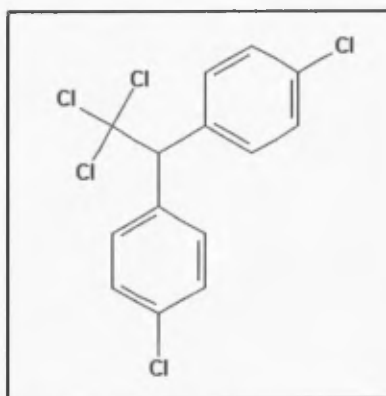


Fig. 4. Estructura bidimensional del DDT: insecticida organoclorado. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3036 [Imagen en línea]. Recuperado el 25 de marzo, 2017, de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3036>.

Los insecticidas organoclorados actúan como disruptores del sistema nervioso; poseen una elevada toxicidad, un efecto residual prolongado en el ambiente y tienden a bioacumularse en la cadena alimenticia (Zacharia, 2011). Algunos ejemplos de pesticidas organoclorados de uso común incluyen al DDT, lindano, endosulfán, aldrín, dieldrín y clordano.

b. Organofosforados

Compuestos que poseen un grupo fosfato como marco estructural básico (Fig. 5). Actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. A diferencia de los organoclorados, los insecticidas organofosforados poseen una baja persistencia en el ambiente ya que se descomponen fácilmente (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013; Zacharia, 2011). Algunos ejemplos de insecticidas organofosforados incluyen el paratión, malatión, diazinón y glifosato.

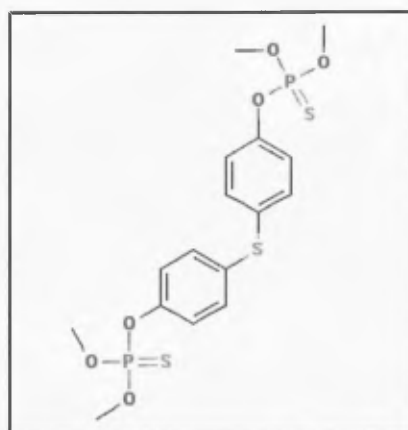


Fig. 5. Estructura bidimensional del insecticida organofosforado temefos. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5392 [Imagen en línea]. Recuperado el 25 de marzo, 2017, de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5392>.

c. Carbamatos

Insecticidas derivados del ácido carbámico (Fig. 6). Poseen un modo de acción similar al de los insecticidas organofosforados, inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, aunque este efecto puede ser reversible y los insectos pueden sobrevivir a su acción (Zacharia, 2011).

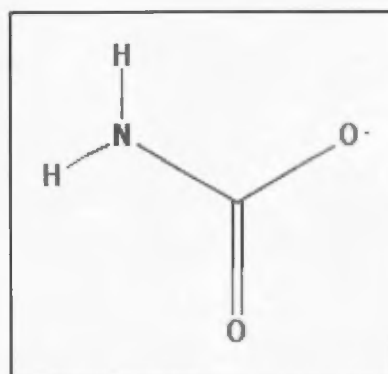


Fig. 6. Estructura bidimensional de los insecticidas carbamatos. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=276 [Imagen en línea]. Recuperado el 25 de marzo, 2017, de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/276>.

d. Piretroides

Compuestos orgánicos sintéticos análogos a las piretrinas extraídas de la planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Las piretrinas son insecticidas eficaces; sin embargo, su degradación fotoquímica es tan rápida que su uso como insecticida agrícola resulta poco práctico. Los piretroides se desarrollaron mediante la introducción de un motivo bifenoxi y la sustitución de algunos hidrógenos con halógenos, a fin de conservar las propiedades básicas de las piretrinas de manera estable (Fig. 7) (Zacharia, 2011).

Los piretroides ocasionan un efecto de derribo (knocking down) sobre los insectos, afectando la generación y conducción de los impulsos nerviosos. Se consideran compuestos seguros en comparación con el resto de los insecticidas, debido a su baja toxicidad en los mamíferos y fácil degradación ambiental (Eldridge, 2008). Se clasifican en dos tipos: los piretroides Tipo I, que carecen del grupo α -ciano, y los piretroides Tipo II, los cuales poseen un grupo α -ciano-3-fenoxilbencil (Smith *et al.*, 2016). Los piretroides más ampliamente utilizados incluyen la permetrina, cipermetrina y deltametrina.

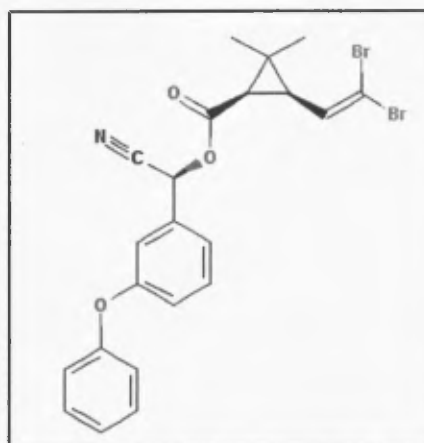


Fig. 7. Estructura bidimensional de la deltametrina: insecticida piretroide. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=40585 [Imagen en línea]. Recuperado el 25 de marzo, 2017, de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40585>.

2.3. Control biológico

El control biológico es un método para el control de las poblaciones de mosquitos y otros vectores que consiste en la introducción de patógenos, depredadores u otros organismos, como peces larvívoros y copépodos, efectivos en el control de las larvas de *Aedes*. En este tipo de estrategia es importante el monitoreo y la reposición sostenida de los organismos a fin de lograr un control sostenido, además deben emplearse especies nativas ya que las especies exóticas pueden amenazar la fauna endémica (WHO, 2014).

La efectividad en el uso de micro-crustáceos larvívoros como estrategia de control biológica contra el Dengue, fue evidenciada a través de un programa realizado en Vietnam. La aplicación de esta estrategia, en conjunto con la participación comunitaria y el desarrollo de campañas de promoción de la salud, demostró una reducción significativa tanto en las poblaciones de mosquitos como en el número de casos de Dengue (Julo-

Reminiac *et al* 2014)

Otra de las estrategias biológicas empleadas para el control de las poblaciones de *Aedes* consiste en el uso de *Wolbachia* bacteria endosimbionte de algunas especies de insectos que tiene la habilidad de alterar ciertas funciones en los hospederos. Esta técnica basada en el fenómeno natural de incompatibilidad citoplasmática consiste en cruzar machos infectados con *Wolbachia* con hembras no infectadas o hembras infectadas con una cepa distinta, lo que lleva a una letalidad embrionaria que se traduce en un reemplazo o en una supresión poblacional (Baldacchino *et al* 2015 Huang *et al* 2017 Lees *et al* 2015 McGraw & O'Neill 2013)

La presencia de *Wolbachia* también interfiere con el desarrollo de una amplia gama de patógenos tales como nematodos, bacterias, virus y protozoos. Por ejemplo, la infección por *Wolbachia* limita la capacidad de las hembras de *Ae. aegypti* de transmitir el DENV, CHIKV y el YFV (Iturbe Ormaetxe *et al* 2011)

2.4 Control mediante herramientas genéticas

El control mediante herramientas genéticas es una estrategia que se centra en la modificación de los vectores. La técnica de insectos estériles (SIT por sus siglas en inglés) es la más antigua y más probada de este tipo de estrategias. Esta basada en la exposición de los insectos machos a irradiación gamma (γ) o a esterilización química, causando grandes daños cromosómicos al azar o mutaciones letales dominantes en los gametos, lo que impide que los machos al ser liberados al ambiente produzcan crías.

viables (Alphey, 2014; Baldacchino *et al.*, 2015; McGraw & O'Neill, 2013).

Una de las estrategias más recientes empleada para el control del *Aedes*, fue adaptada a partir de la herramienta SIT y consiste en la liberación de insectos que portan un gen letal dominante. La tecnología mejor conocida como RIDL (Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene), introduce la expresión del gen letal en las poblaciones de vectores mediante la liberación de mosquitos machos transgénicos (Baldacchino *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017). Básicamente los transgenes inducen la mortalidad en pupas y adultos, o puede reducir la expresión de un gen que actúa en el músculo del vuelo en las pupas de sexo femenino, resultando en la producción de hembras incapaces de alimentarse y reproducirse (Alphey, 2014; Huang *et al.*, 2017; McGraw & O'Neill, 2013).

3. Control de las poblaciones de *Aedes* en Panamá

En Panamá, las poblaciones de *Aedes* han sido objeto de programas de control desde las campañas “Anti-Fiebre Amarilla” desarrolladas durante la primera década del siglo XX que se implementaron particularmente en la Zona del Canal y en áreas adyacentes a ésta (Gorgas, 1915). En 1943, en las ciudades de Panamá y Colón, se implementó un programa para el control del *Ae. aegypti*, que permitió mantener los índices de infestación por debajo del 0.5%. Este programa fue reforzado en 1949, debido a la aparición de la fiebre amarilla selvática (Courtney, 1950).

En 1947 el Departamento de Salud inauguro el Programa Antimalarico en los principales centros urbanos del pais asi como en determinadas zonas rurales de alta incidencia malarica, a traves del control de las poblaciones de *Anopheles* con el insecticida DDT (Courtney 1950 Caceres 1999) al ser *Ae aegypti* mas susceptible al DDT fue razonable pensar que los poblados y ciudades bajo fumigacion debieron estar libre de mosquitos *Ae aegypti* (Courtney 1950) Ademas como medida para evitar una reintroduccion de *Ae aegypti* al pais se inspeccionaba y fumigaban las embarcaciones que llegaban a los principales puertos con DDT a intervalos de seis meses (Courtney 1950)

Las poblaciones de mosquitos vectores en Panama han estado sometidas a una continua presion selectiva de insecticidas organoclorados (DDT y dieldrina) carbamatos (propoxur y bendiocarb) organofosforados (fenitrothion malathion fenitrothion y temefos) y piretroides (deltametrina, lambda cihalotrina y ciflutrina) la aplicacion de estos compuestos quimicos inicio en el año 1957 a traves del Servicio Nacional de Erradicacion de la Malaria (SNEM) a raiz de la firma del Convenio Tripartito (OPS/OMS UNICEF Gobierno Nacional) para la erradicacion de la malaria del territorio nacional (Caceres *et al* 2013 Caceres 1999)

Las actividades para el control de las poblaciones de *Aedes* se iniciaron de manera oficial en el año 1969 a traves de la Campaña de erradicacion del *Ae aegypti* desarrollada por el Ministerio de Salud Durante la decada de los 80 esta paso a denominarse Campaña de Control del *Ae aegypti* posteriormente el MINSA integro el SNEM con el Programa de

Control del *Ae. aegypti* y creó el Departamento de Control de Vectores. Actualmente, este Departamento coordina la Sección de Control de los *Aedes*, cuyas actividades están dirigidas contra los vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (G. Ruíz, comunicación personal, 27 de abril de 2017; J. Lasso, comunicación personal, 29 de mayo de 2017).

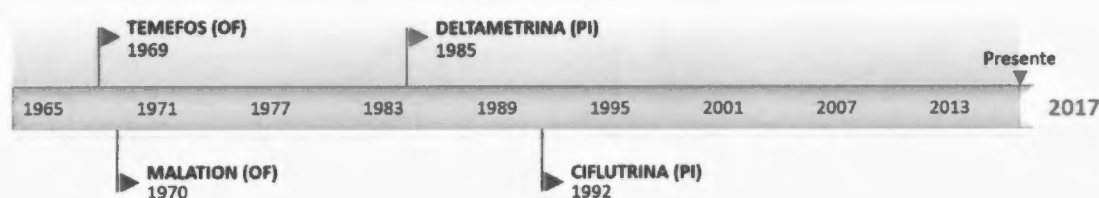


Fig. 8 Línea de tiempo del uso de insecticidas químicos, aplicados para el control de las poblaciones de *Aedes* spp. en Panamá (Basado en la información proporcionada por G. Ruíz y J. Lasso, funcionarios del Departamento de Control de Vectores del MINSA).

Desde el año 1969, se emplea el temefós (Abate) para el control de las larvas (tratamiento focal) de *Aedes*, a la dosis de 1 ppm. A partir de la década del 70 hasta el año 1985, se emplearon rociamientos de malatión como tratamiento perifocal de efecto residual para el control de las poblaciones de mosquitos adultos, a una concentración que iba del 57% al 96%; sin embargo, desde el año 1985 hasta la fecha se aplican nebulizaciones con el piretroide deltametrina al 0.27% (2.7g/L), mezclado con diesel como solvente. Desde el año 1992 hasta el 2016, se aplicaron nebulizaciones con ciflutrina (Solfac) al 1.5%, en las regiones de menor riesgo de transmisión (Fig. 8); no obstante, se suspendió su uso debido a inconvenientes con su adquisición en el mercado (G. Ruíz, comunicación personal, 27 de abril de 2017; J. Lasso, comunicación personal, 29 de mayo de 2017).

Con el objetivo de realizar una alternancia en la aplicación de insecticidas contra el *Aedes* el Departamento de Control de Vectores destinaba la aplicación del insecticida deltametrina a las regiones de salud que presentaban los índices de infestación más elevados y la ciflutrina era utilizada en el resto de las regiones (J Lasso comunicación personal 29 de mayo de 2017). También en las regiones de salud de Colon Cocle y Bocas de Toro se utilizó durante un tiempo el insecticida Icon® 2.5 E.C. un piretroide hecho a base de lambda cihalotrina (G Ruiz comunicación personal 27 de abril de 2017). Esta dinámica de aplicación alternada puede ser catalogada como un tipo de aplicación en mosaico.

La aplicación de insecticidas en mosaico consiste en fumigar un compuesto en un área geográfica, y un compuesto o insecticida de otra clase y/o modo de acción en áreas vecinas de manera que algunas poblaciones de mosquitos son expuestas a un tipo de insecticida y el resto de las poblaciones a otro tipo (WHO 2011, 2016). Los programas de fumigación en rotaciones y mosaicos asumen que la frecuencia de resistencia puede disminuir en ausencia de selección debido al *fitness cost* o a la dilución a través de la mezcla con las poblaciones susceptibles circundantes (WHO 2011). Sin embargo, esta estrategia aunque teóricamente robusta, es logísticamente difícil de implementar especialmente durante una epidemia, donde la respuesta rápida es clave para contener un brote de la enfermedad (WHO 2016).

Otra medida que emplea el personal de Control de Vectores del MINSA para el tratamiento focal de las larvas de *Aedes* es el uso del diflubenzuron, un inhibidor de la

La síntesis de quitina es aplicado desde el año 2004. Actualmente también se está empleando el VectoBac 37WG, un larvicida biológico preparado con la cepa AM 65 52 de *Bacillus thuringiensis* (G. Ruiz, comunicación personal, 27 de abril de 2017).

3.1 Vigilancia entomológica y control de los vectores

La vigilancia entomológica y el control de los vectores constituyen un conjunto de acciones orientadas al registro sistemático de la información técnica/operativa sobre la distribución de *Aedes* y la medición relativa de sus poblaciones a lo largo del tiempo, con el fin de conducir un análisis constante que permita prevenir y/o controlar su dispersión. Con la finalidad de implementar acciones de control oportunas y eficaces, las actividades de vigilancia y control de *Aedes* se implementan en todas las regiones del país que reportan o no la presencia de estos vectores y/o que presenten localidades con riesgo de introducción de los mismos (OPS, 2014).

En Panamá, los niveles de infestación vectorial se estiman utilizando métodos entomológicos de vigilancia de larvas basados en una encuesta entomológica sistemática, que permite establecer los índices de infestación de *Aedes* y las áreas de riesgo de transmisión de las diferentes arbovirosis. Los niveles de infestación se cuantifican con la encuesta del 100% de las viviendas en un conglomerado y el número de recipientes con larvas por hogar. A su vez, las viviendas se marcan como positivas si se encuentra presencia de larvas en al menos un recipiente (Carrera *et al.*, 2017).

El índice de viviendas con *Aedes* en una localidad se obtiene multiplicando por 100 el

numero de viviendas positivas entre el total de viviendas inspeccionadas en el area un indice de vivienda mayor a cuatro (>4) representa un riesgo alto entre dos a cuatro (2-4) indica un riesgo moderado e indices menores a dos (<2) corresponden a un riesgo bajo de infestacion del vector (OPS 2014) Otros de los indices empleados para evaluar niveles de infestacion de *Aedes* son el indice de recipientes indice de Breteau indice de recipientes destruidos indice de infestacion de manzanas e indice de pupas El Departamento de Control de Vectores establece un rango de alto riesgo de trasmision de arbovirosis a partir del 2% de infestacion (J Lasso comunicacion personal 29 de mayo de 2017)

El Programa de Control de *Aedes* ha señalado muestrear al menos el 10% de los predios existentes en una localidad o corregimiento mediante la encuesta entomologica cuatrimestral la cual se realiza durante los meses de abril agosto y diciembre Sin embargo existen corregimientos que rebasan los 30 mil predios lo que hace imposible muestrear todo el corregimiento Ante esta situacion se diseña la encuesta entomologica por conglomerado en la cual se subdivide la totalidad de los predios en cada corregimiento o localidad en 20 segmentos (OPS 2014)

Con el objeto de clasificar y registrar los diferentes tipos de criaderos que pueden en un momento dado convertirse en focos del vector el Departamento de Control de Vectores ha agrupado los mismos segun el grado de utilidad o beneficio para las personas en a) criaderos utiles los cuales corresponden a recipientes artificiales que representen algun beneficio o utilidad b) criaderos no utiles o inservibles son recipientes artificiales

desechados que no representan ningun beneficio o utilidad c) criaderos naturales corresponden a las cavidades de arboles plantas y rocas En su mayoria, las encuestas entomologicas que levanta el Departamento de Control de Vectores indica que alrededor del 60% de los criaderos de *Aedes* corresponden a recipientes utiles (G Ruiz comunicacion personal 27 de abril de 2017)

Las medidas de control vectorial en Panama estan basadas en los niveles de infestacion de los vectores en los vecindarios con riesgo de infestacion alto y moderado el Departamento de Control de Vectores aplica las medidas de control quimico (nebulizaciones) en todas las calles cada dos semanas con deltametrina Para cada caso sospechoso de DENV CHIKV o ZIKV en el vecindario independientemente del indice de infestacion (alto moderado o bajo riesgo) el personal de control de vectores elimina los sitios de reproduccion dentro de las casas y en el area peridomiciliar (Carrera *et al* 2017 G Ruiz comunicacion personal 27 de abril de 2017 J Lasso comunicacion personal 29 de mayo de 2017)

La aplicacion de larvicidas como el temefos y el diflubenzuron se circunscribe a aquellos recipientes en los que no es posible su eliminacion la nebulizacion directa y la aplicacion de larvicidas dentro de las casas y area peridomiciliar se realiza simultáneamente cuando existan casos sospechosos y/o confirmados de DENV CHIKV y ZIKV (Carrera *et al* 2017 J Lasso comunicacion personal 29 de mayo 2017)

Es relevante mencionar que las ultimas encuestas entomologicas indican que las

Regiones de Salud que presentan los índices de infestación más elevados son las de San Miguelito, Panamá Norte, Panamá Oeste, Guna Yala y la Región Metropolitana de Panamá, por ende son consideradas localidades prioritarias para ejercer medidas de control vectorial (G Ruiz comunicación (J Lasso comunicación personal 27 de abril de 2017). A su vez, dentro de la Región Metropolitana, los corregimientos de Bethania, Parque Lefevre, Juan Díaz, Río Abajo y Mañanitas son algunos de los que continuamente presentan los niveles de infestación más altos (J Lasso comunicación personal 29 de mayo de 2017).

4 Resistencia frente a insecticidas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la resistencia como una característica heredada que confiere una mayor tolerancia a un pesticida, o grupo de pesticidas, de manera que los individuos resistentes sobreviven a una concentración del (los) compuesto(s) que normalmente sería (n) letal (es) para la especie (WHO 1957 1992).

El Comité de Acción para la Resistencia de los Insecticidas (IRAC) define la resistencia como la selección de una característica hereditaria en una población de insectos que da como resultado el fracaso repetido de un producto insecticida para proporcionar el nivel de control deseado cuando se usa como es recomendado. De acuerdo con esta definición técnica, las diferencias en la susceptibilidad aparente en los bioensayos de laboratorio no necesariamente pueden constituir resistencia si la diferencia no da lugar a un cambio en el

rendimiento de campo del insecticida (IRAC 2011)

La mayoría de los mecanismos de resistencia a insecticidas se pueden dividir en dos grupos: mecanismos metabólicos causado por alteraciones en los niveles o actividad de las proteínas de desintoxicación y mecanismos de sitios diana, causado por mutaciones en el gen de las proteínas canal de sodio así como en los genes de los receptores de acetilcolinesterasa y del ácido gamma amino butírico (Bisset *et al* 2014 Liu 2015)

Adicional a los mecanismos citados la IRAC (2011) incluye la resistencia por reducción a la penetración y la resistencia por comportamiento. La primera es causada por modificaciones en la cutícula del insecto o del recubrimiento del tracto digestivo que evita o disminuye la absorción o penetración del insecticida y la segunda, describe cualquier modificación en el comportamiento de los insectos que ayude a evitar los efectos letales de los insecticidas.

En algunas especies de insectos ha sido posible observar resistencia múltiple frente a diferentes clases de insecticidas provocando que el control a través de métodos químicos sea extremadamente difícil y costoso. Este tipo de resistencia involucra mecanismos de resistencia independientes los cuales al estar presente simultáneamente en los insectos propician la resistencia a múltiples clases de químicos. Por ejemplo, resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos (IRAC 2011 Karunamoorthi & Sabesan 2013)

Otra variante de resistencia que puede presentarse es la resistencia cruzada, la cual ocurre cuando un mecanismo de resistencia que permite a los insectos resistir a un insecticida también confiere resistencia a los compuestos dentro de la misma clase química, dependiendo del mecanismo (IRAC 2011) este tipo de resistencia podría perjudicar sustancialmente el uso de los insecticidas existentes debido a alteraciones en los sitios blanco o en los procesos de desintoxicación (Karunamoorthi & Sabesan 2013)

La resistencia a insecticidas ha sido propuesta como un fenómeno preadaptativo en el sentido de que previo a la exposición de un organismo a un agente estresante (en este caso un mosquito expuesto a un insecticida) ya existen individuos que portan uno o más alelos de resistencia (polimorfismos en la secuencia del alelo de resistencia o aumento de la expresión del alelo de resistencia) que permite que los insectos sobrevivan a la exposición del agente estresante (Xu *et al* 2012)

Según la Food and Agriculture Organization (FAO 2012) los alelos de resistencia pueden presentarse en tres variantes dominante dominante parcial o recesivo Si es dominante o dominante parcial solo uno de los progenitores necesita poseer la característica para que sea total o parcialmente expresado en la descendencia y si es recesivo ambos progenitores deben poseer el rasgo Afortunadamente la mayoría de los mecanismos de resistencia son controlados por alelos recesivos o semi dominantes lo que retrasa su propagación dentro de la población

Liu (2015) resalta que la proporción de individuos que portan los polimorfismos o alelos

de resistencia debe aumentar después de la selección del insecticida, por ende la descendencia manifestará una mayor tasa de supervivencia, donde eventualmente los individuos resistentes serán el grupo predominante en la población. Estudios realizados sobre la herencia de la resistencia al insecticida permetrina en la especie *Culex quinquefasciatus* muestran evidencia que dicho rasgo es heredado de manera autosómica recesiva incompleta (Li & Liu 2010)

5 Proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje

Un canal iónico es un complejo de proteína transmembranal que forma un poro acuoso a través de la bicapa de lípidos mediante el cual un ion inorgánico específico (sodio calcio o potasio) puede difundir su gradiente electroquímico (Zlotkin 1999). Los Canales de Sodio Dependiente de Voltaje (CSDV) son proteínas que cumplen la función de generar y propagar potenciales de acción en las células nerviosas (a nivel de los axones) y en la mayoría de las células excitables (Catterall 2000 Dong 2007 Dong *et al* 2014)

5.1 Estructura de la proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje

La subunidad alfa (α) de la proteína CSDV está compuesta por cuatro dominios homólogos (I-IV) y cada uno de estos dominios está conformado a su vez por 6 segmentos transmembranales o hidrofóbicos. En cada dominio los segmentos 1-4 (S1-S4) constituyen el módulo sensor de voltaje mientras que los segmentos S5 y S6 y la región P o bucle conector conforman el módulo del poro (Fig. 9) (Dong *et al* 2014 Du *et al* 2013 Rinkevich *et al* 2013 Shen *et al* 2017)

La caracterización química de la proteína CSDV de diferentes eucariotas, indica que la subunidad α posee un peso molecular de 240 a 280 kDa y una longitud de 1,800 a 2,000 aminoácidos; en tanto, la expresión de la proteína CSDV de *Drosophila* en oocitos de *Xenopus*, ha permitido determinar que subunidad α tiene un peso aproximado de 241 kDa (Zlotkin, 1999).

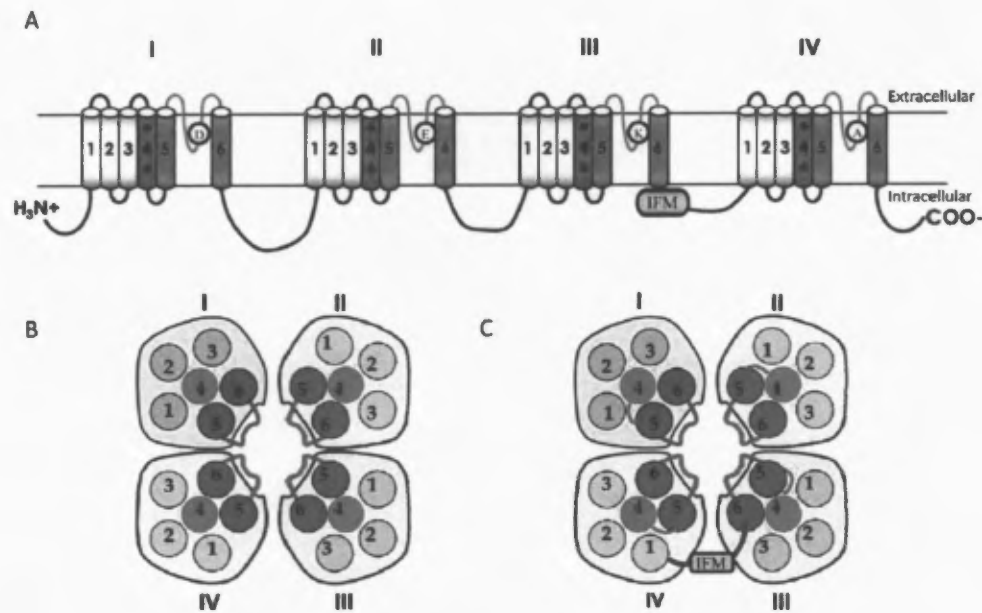


Fig. 9 Representación esquemática de la subunidad α de la proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje (CSDV). A). Topología de la subunidad α del CSDV en la cual se muestran los dominios (I-IV) y segmentos transmembranales (S1-S6) que lo conforman. B y C). Representación esquemática de la vista extracelular e intracelular del CSDV. (Dong *et al.*, 2014).

La selectividad iónica de los canales de sodio está determinada por los aminoácidos D (ácido aspártico), E (ácido glutámico), K (lisina) y A (alanina), conocido como filtro de selectividad o motivo DEKA, ubicados en posiciones análogas de los dominios I, II, III y IV, respectivamente; cada segmento S4 contiene motivos repetidos de residuos de

aminoácidos con carga positiva seguido de dos residuos hidrofóbicos que sirve como un sensor de voltaje del canal de sodio (Dong *et al* 2014 Rinkevich *et al* 2013)

5.2 Gen de la proteína Canal de Sodio Dependiente de Voltaje

El gen responsable en codificar para la proteína CSDV es el gen *para* en insectos fue clonado por primera vez de *Drosophila melanogaster* por lo que es denominado *DmNa_v*, la estructura general y secuencia de aminoácidos de la proteína *DmNa_v* comparte una elevada similitud con la secuencia de la subunidad α del canal de sodio presente en mamíferos donde características estructurales críticas como selectividad de iones y el proceso de *gating* (apertura/cierre) del canal están conservados (Dong *et al* 2014)

Actualmente se han expresado cuatro genes *DmNa_v* ortólogos en oocitos de *Xenopus* el gen *Vssc1* de *Musca domestica* (Smith *et al* 1998) el gen *BgNav* de *Blattella germanica* (Liu *et al* 2000) el gen *VmNa_v* de *Varroa destructor* (Du *et al* 2009) y el gen *AaNa_v* de *Aedes aegypti* (Du *et al* 2013)

En ensayos realizados con la proteína TipE de *D. melanogaster* se ha observado la coexpresión del gen *TipE* y el gen *para* en oocitos de *Xenopus* propiciando así una expresión robusta de la proteína CSDV de este modo la proteína TipE la cual está presente en otras especies de insectos es considerada una subunidad auxiliar para el funcionamiento del CSDV en insectos ejerciendo un rol similar al de la subunidad β presente en los CSDV de mamíferos (Dong 2007 Dong *et al* 2014 Du *et al* 2013 Wang *et al* 2013) Además cuatro proteínas homólogas a TipE (Teh1 Th4) se

encuentran codificadas en el genoma de *D. melanogaster* y en otras especies de insectos las cuales experimentalmente han modulado la expresion y las propiedades de *gating* de la proteina DmNav (Dong *et al* 2014 Li *et al* 2011 Wang *et al* 2013)

5.3 Funcionamiento del Canal de Sodio Dependiente de Voltaje

El canal de sodio forma un poro en la membrana altamente selectivo para los iones sodio la apertura y cierre del canal de sodio se regula por dos procesos dependientes de voltaje la activacion y la inactivacion (Dong *et al* 2014) Cuando una neurona esta en reposo los canales de sodio estan cerrados pero cuando la membrana de una neurona se despolariza, se activan los canales de sodio y el influjo de iones sodio genera un potencial de accion (Shen *et al* 2017)

En respuesta a la despolarizacion el segmento S4 se mueve hacia el exterior iniciando la activacion lo cual resulta en la apertura de la compuerta de activacion (presumiblemente formado por el extremo intracelular del segmento S6) unos cuantos milisegundos despues de la apertura del canal este se inactiva y se cierra (Dong *et al* 2014 Rinkevich *et al* 2013)

El proceso de inactivacion es mediado por el motivo IFM (MFM en insectos) el cual esta conformado por residuos de aminoacidos (Ile o Met/Phe/Met) que se ubican entre los segmentos III y IV y que cumplen la funcion de bloquear el poro interno del canal posterior a la repolarizacion el sensor de voltaje S4 se mueve hacia atras provocando cambios conformacionales que llevan el cierre de la compuerta de activacion proceso

conocido como desactivación de canales (Dong *et al* 2014 Rinkevich *et al* 2013) Las transiciones entre los estados de cierre y apertura están ligadas intrínsecamente con la generación y propagación de impulsos eléctricos (Rinkevich *et al* 2013)

5.4 Efecto de los insecticidas sobre los Canales de Sodio Dependientes de Voltaje

Debido al importante papel que desempeñan los CSDV en la excitabilidad de las membranas celulares constituyen un blanco para un amplio rango de neurotoxinas también son el blanco principal de compuestos sintéticos como el DDT piretroides y drogas terapéuticas como los anestésicos (Dong *et al* 2014)

Los piretroides interactúan a nivel de los CSDV de los insectos alterando la cinética de activación de la proteína canal y prolongando la corriente asociada con la despolarización de la membrana en las células nerviosas (Field *et al* 2017 Narahashi 1996 Rinkevich *et al* 2013 Smith *et al* 2016 Vais *et al* 2001) como consecuencia estos químicos interrumpen la función del nervio causando descargas repetitivas despolarización de la membrana y alteración sináptica, lo que conduce a la paralización y muerte del insecto (Field *et al* 2017 Soderlund 2012)

Los insecticidas piretroides fueron introducidos de manera generalizada a mediados de 1970 con el fin de controlar insectos de plagas agrícolas así como insectos vectores de enfermedades éstos compuestos constituyen también un elemento común presente en insecticidas caseros y en productos para el control de ectoparásitos en mascotas (Field *et al* 2017 Soderlund 2012)

6 Desarrollo de la Resistencia Knockdown en insectos

La resistencia knockdown o *kdr* conocida tambien como resistencia al derribo es uno de los principales tipos de resistencia a piretroides y al DDT en la cual los insectos no llegan a perder la coordinacion de manera inmediata despues de la exposicion al insecticida (Aguirre Obando *et al* 2015)

Este tipo de resistencia es causada por mutaciones puntuales no silenciosas que ocurren a nivel de la secuencia de nucleotidos del gen *para* el cual codifica la proteina CSDV particularmente estas mutaciones conducen a cambios en algunos de los aminoácidos que conforman la proteina provocando una reduccion en la union con el insecticida (Alvarez *et al* 2015 Dong *et al* 2014 Donnelly *et al* 2009 Hemingway & Ranson 2000)

6.1 Estudios sobre la Resistencia Knockdown en poblaciones de *Aedes*

En distintos grupos de insectos ha sido posible documentar la presencia de mutaciones *kdr* a nivel del dominio II (alelos de tipo salvaje Ser989 Ile1011 Leu1014 y Val1016) y en el dominio III (alelo de tipo salvaje Phe1534) del CSDV (Kasai *et al* 2011) ademas la mayoria de estas se encuentran a nivel del segmento 6 especificamente II6 y III6 de la proteina (Brito *et al* 2013)

En *Ae. aegypti* se han reportado alrededor de doce mutaciones no sinonimas en nueve puntos diferentes (Chang *et al* 2009 Harris *et al* 2010 Kushwah *et al* 2015 Linss *et al* 2014 Saavedra Rodriguez *et al* 2007) particularmente las mutaciones Ile1011Val/Met Val1016Ile y Phe1534Cys han sido correlacionadas con mayor

frecuencia con la resistencia a piretroides (Dong *et al* 2014) En *Ae albopictus* se ha reportado una alta frecuencia de la mutacion Phe1534Cys (Kasai *et al* 2011) así como de la mutacion Phe1534Leu (Marcombe *et al* 2014)

Los informes de estudios de campo y laboratorio realizados en países de Norte y Sur America revelan una rapida diseminacion de la resistencia a piretroides y un incremento drastico en la tasa de la mutacion Val1016Ile en las poblaciones de *Ae aegypti* (Garcia *et al* 2009 Marcombe *et al* 2012 Martins *et al* 2009)

Linss *et al* (2014) sugieren que la coocurrencia de dos alelos *kdr* estan contribuyendo a la resistencia frente a piretroides uno es debido a la sustitucion restringida a la posicion Phe1534 y la otra consiste en sustituciones simultaneas en ambos sitios Val1016 y Phe1534 En tanto estudios realizados en poblaciones de *Ae Aegypti* provenientes de Latino America, han indicado la presencia de las mutaciones Ile1011M Val1016Ile y Phe1534Cys (Aguirre Obando *et al* 2015 Aguirre Obando *et al* 2016 Brengues *et al* 2003 Garcia *et al* 2009 Linss *et al* 2014 Martins *et al* 2009)

6.2 Impacto de la resistencia en el control de mosquitos vectores

Los programas de control de vectores se enfrentan a dos grandes limitaciones la primera esta relacionada con el desarrollo de mecanismos de resistencia en los insectos y la segunda, corresponde al limitado numero de insecticidas que se comercializan Actualmente la OMS aprueba el uso de solo cuatro clases de insecticidas organoclorados carbamatos organofosforados y piretroides motivo por el cual deben

aplicarse con precaucion a fin de retardar la evolucion de la resistencia (David *et al* 2013 Smith *et al* 2016)

Precisamente Ranson *et al* (2010) han resaltado que la evolucion y propagacion de la resistencia a insecticidas es una preocupacion importante para el control de las enfermedades transmitidas por artropodos y el Dengue no es la excepcion la mayor parte de los programas de control de las poblaciones de *Aedes* estan basados en el uso de solo dos de las cuatro clases de insecticidas disponibles para su uso en salud publica, lo cual plantea una presion de seleccion adicional sobre los vectores

La resistencia particular a los piretroides y la consecuente resistencia cruzada con otros insecticidas constituye un problema critico que ha dado lugar a la reemergencia de enfermedades transmitidas por vectores en muchas regiones El aumento de la resistencia de los mosquitos a los insecticidas ha sido identificado en mas de 60 paises afectando a las principales especies de vectores e involucrando a las cuatro clases de insecticidas (Liu 2015)

Cabe resaltar que la resistencia frente a insecticidas ha sido estudiada mas a fondo en *Ae aegypti* que en *A albopictus* pero en aquellos casos en que ambas especies han sido examinadas los niveles de resistencia son generalmente mas altos para *A aegypti* en esta especie se ha comprobado el desarrollo de resistencia frente a las cuatro clases de insecticidas mencionadas lo que ha comprometido el exito de las intervenciones para su control (Naqqash *et al* 2016 Ranson *et al* 2010)

La resistencia de *A. aegypti* y *A. albopictus* frente a piretroides es considerada un problema global con una variación geográfica sustancial. Por ejemplo, los niveles de resistencia en adultos generalmente son más bajos en Asia, África y Estados Unidos; en tanto los niveles más elevados se encuentran en el Caribe, México y Sudamérica, aunque también se reporta la presencia de poblaciones susceptibles. En contraste, los niveles de resistencia más elevados se han registrado en larvas procedentes de Asia y los más bajos en aquellas generalmente procedentes del Caribe (Smith *et al.*, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo

1.1. Población de estudio

Los mosquitos analizados en el presente estudio fueron obtenidos de las colectas realizadas en el proyecto: **“Evaluación en campo de diagnóstico novedoso en la lucha contra *Aedes* spp. y Dengue”**, financiado por la Embajada de Reino Unido/Foreign and Commonwealth Office y ejecutado por el Departamento de Investigación en Entomología Médica (DIEM) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES).

1.2. Descripción de los sitios de colecta

Se colectaron mosquitos en cinco localidades de la región Metropolitana de Panamá (Fig. 10). Las localidades de muestreo se seleccionaron en base a los criterios de: alta incidencia de Dengue y niveles de infestación con mosquitos *Aedes* de altos a moderados (MINSA, 2015). En cada localidad se eligieron de 25 a 30 viviendas de manera aleatoria, las cuales se evaluaron durante un periodo de cuatro semanas consecutivas.

A continuación, se describen las características de las localidades de muestreo.

- a. Nuevo Chorrillo. Comunidad semiurbana ubicada al oeste de la Ciudad de Panamá, distrito de Arraiján, corregimiento de Cerro Silvestre, a 8°57'36.09"

latitud norte y 79°41'54.48" longitud oeste. La población estimada de Nuevo Chorrillo es de 4,431 habitantes, ubicados en alrededor de 1,169 viviendas (INEC, 2010); la densidad poblacional promedio es de 4 individuos por vivienda. En los linderos de Nuevo Chorrillo se ubican remanentes de bosque secundario. La superficie total de Nuevo Chorrillo es de 5.85 km², de la cual se muestreo un área de 0.061 km². La comunidad cuenta con un centro de salud de atención primaria, así como con los servicios básicos de recolección de basura y abastecimiento de agua potable.

b. Princesa Mía. Comunidad semiurbana ubicada al oeste de la Ciudad de Panamá, perteneciente al distrito de Arraiján, corregimiento de Cerro Silvestre, a 8°58'1.29" latitud norte y 79°42'8.92" longitud oeste. La comunidad presenta un crecimiento urbanístico organizado; está conformada por alrededor de 447 viviendas. La población estimada es de 1,610 habitantes (INEC, 2010) y una densidad poblacional promedio de 2.5 a 3 individuos por vivienda. Princesa Mía abarca una superficie de 0.177 km², de la cual se muestreo un área de 0.036 km². La comunidad cuenta con un centro de salud de atención primaria, así como con los servicios básicos de recolección de basura y abastecimiento de agua potable.

c. Lluvia de Oro. Comunidad ubicada al oeste de la Ciudad de Panamá, perteneciente al distrito de Arraiján, corregimiento de Cerro Silvestre a 8°57'36.57" latitud norte y 79°41'56.28" longitud oeste. La comunidad

manifiesta un crecimiento urbanístico organizado. La población estimada de Lluvia de Oro es de 171 habitantes ubicados en alrededor de 54 viviendas (INEC 2010). La densidad poblacional promedio es de 3 individuos por vivienda. Lluvia de Oro abarca una superficie de 0.174 km² de la cual se muestreo un área de 0.033 km². La comunidad cuenta con un centro de salud de atención primaria, así como con los servicios básicos de recolección de basura y abastecimiento de agua potable.

d. Bethania Corregimiento del distrito de Panama ubicado en el área urbana de la región Metropolitana de Panama, a 9°03'40.4" de latitud norte y 79°31'45.95" de longitud oeste. Está conformado por instalaciones residenciales y comerciales mezcladas con una gran cantidad de parques y áreas verdes. Cuenta con una población estimada de 46.116 habitantes distribuidos en 14.978 viviendas (INEC 2010). La densidad poblacional promedio es de aproximadamente 4 personas por vivienda. Bethania abarca una superficie de 8.59 km² de la cual se muestreo un área de 1.47 km². El corregimiento cuenta con una Policlínica de la Caja del Seguro Social y dispone de los servicios básicos de recolección de basura y abastecimiento de agua potable las 24 horas del día.

e. Las Garzas Poblado semiurbano ubicado en el corregimiento de Pacora, al este del área Metropolitana de Panama a 9°7'6.00" de latitud norte y 79°15'47.32" de longitud oeste. La comunidad presenta un crecimiento

urbanístico desorganizado. Cuenta con una población estimada de 2,427 habitantes, distribuidos en 733 viviendas (INEC, 2010); la densidad poblacional media es de aproximadamente 5.5 personas por vivienda. Las Garzas abarca una superficie de 0.78 km², de la cual se muestreo un área de 0.44 km². El servicio de recolección de basura es inadecuado, así como el suministro de agua potable; el abastecimiento de agua es realizado por carros cisternas pertenecientes al Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales por lo que es común el uso de tanques de reserva de agua en las viviendas. La comunidad cuenta con un centro de salud de atención primaria.



Fig. 10 Imagen satelital (Google Earth-Landsat/Copernicus, marzo 2017) que señala las localidades de muestreo de las cuales provienen las muestras de mosquitos empleadas en la investigación.

1.3 Metodo para la captura de mosquitos

Para la captura de los mosquitos se emplearon dos tipos de trampas ovitrampas Trap N Kill™ (Mosquito Science™ Estados Unidos) y las BG Sentinel® (Biogents Alemania) las cuales se colocaron de manera contigua en el peridomicilio de las viviendas muestreadas particularmente cerca del área de la lavandería.

Tanto a las ovitrampas Trap N Kill™ como las trampas BG Sentinel® se les asignó una codificación que incluía las iniciales del tipo de trampa, las iniciales de la localidad de muestreo y el número de la vivienda muestreada. A continuación se describe la mecánica de muestreo con los dos tipos de trampas.

a Ovitrampas Trap N-Kill™

Las ovitrampas Trap N Kill™ consisten en un recipiente plástico a los cuales se les agrega agua hasta cierto nivel y se les coloca una paleta de cartón comprimido que actúa como sustrato artificial en el cual las hembras gravidas de *Aedes* ovipositan (Fig. 11). Estas trampas se colocaron a inicio de semana (lunes) y se retiraron al quinto día (viernes). Las paletas se transportaron en bolsas Ziploc® al laboratorio para evaluar la presencia de huevos.



Fig 11 Ovitrapa Trap N Kill™ (Mosquito Science™ Estados Unidos) empleada para la captura de huevos de *Aedes* spp (Foto Brigitte Henríquez 2016)

b Trampas BG Sentinel®

Las BG Sentinel® son un tipo de trampa plegable que funciona con una batería de 12 voltios y dispone de un mecanismo central de succión (ventilador) que conduce los mosquitos hasta el depósito de captura (Fig 12) dentro de cada trampa se colocó una sustancia atrayente (BG Lure o algodón impregnado con Octanol) para favorecer la captura de los mosquitos adultos

Las trampas se colocaron a inicio de la semana en las distintas viviendas se monitoreaban diariamente para cambiar la batería y la malla colectora. Con el fin de preservar los especímenes para la identificación taxonómica y los análisis moleculares posteriores las mallas colectoras se transportaron al laboratorio dentro de neveras portátiles con hielo (ice packs)



Fig. 12 Trampa BG-Sentinel® (Biogents, Alemania) empleada para la captura de especímenes adultos de *Aedes* spp (Foto de Luisa Collado, 2016).

1.4. Temporalidad del muestreo

La captura de los mosquitos y huevos de *Aedes* se realizó durante los meses de agosto a noviembre del 2015. En total se colectaron 3,432 especímenes de *Ae. aegypti* y 593 especímenes de *Ae. albopictus*.

2. Procesamiento de muestras en el laboratorio

2.1. Identificación taxonómica

Una vez en el laboratorio, los mosquitos adultos procedentes de campo se almacenaron a una temperatura de -20 °C, hasta el momento de su identificación a nivel de género y especie, para ello se emplearon las claves de Adames & Galindo (1999) y Clark-Gil & Darsie (1983).

En cuanto a las paletas de las ovitrampas estas se dejaron secar al menos tres días aquellas que contenían huevos de *Aedes* se sumergían en bandejas de agua durante dos a tres días hasta que emergieron las larvas. A las larvas se les suministraba TetraMin® pulverizado como alimento hasta alcanzar el estadio de pupa. Las pupas se colocaban dentro de cámaras para cría de mosquitos (Mosquito Breeder BioQuip® Estados Unidos) hasta que emergieron los adultos. Posteriormente estos mosquitos se identificaron con las claves de adultos.

Una vez identificados los mosquitos se colocaron en tubos cónicos de 1.5 mL y se les adicionó 500 µL de DNA/RNA Shield™ (ZYMO RESEARCH Estados Unidos) con el fin de preservar la integridad genética de las muestras e inactivar agentes infecciosos. Los tubos debidamente rotulados se almacenaron a -80 °C. En algunos casos se prepararon *pools* de dos mosquitos por tubo para ello se consideró criterios de agrupación como mosquitos provenientes de la misma trampa, igual sexo, localidad de muestreo y fecha de colecta.

La información sobre las colectas se registró en una base de datos digital la cual contenía datos como localidades de muestreo, viviendas muestreadas, tipo y código de trampa utilizada y cantidad de especímenes colectados por especie de *Aedes*. La base de datos se actualizaba diariamente conforme avanzó el Proyecto.

2.2 Aislamiento de ADN

El ADN genómico de los mosquitos fue aislado empleando el kit de extracción Viral

DNA/RNA™ (ZYMO RESEARCH Estados Unidos) El proceso de extracción se realizó conforme a las instrucciones especificadas por el fabricante con una leve modificación del paso inicial del protocolo

El primer paso consistió en transferir los mosquitos previamente almacenados a 80°C a un tubo cónico de 1.5 mL. Se agregó 200 µL del buffer Viral DNA/RNA se maceró el tejido con un pistilo y se centrifugó a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 10 minutos

La calidad y concentración del ADN aislado se evaluó con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher SCIENTIFIC Estados Unidos). Finalmente las muestras debidamente rotuladas se almacenaron a 80 °C

2.3 Amplificación de fragmentos del gen del CSDV

Con el objeto de identificar la presencia de mutaciones *kdr* en las muestras de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se aplicó la metodología utilizada por Chaves *et al* (2015). Para la amplificación por PCR se emplearon los oligonucleótidos AaSCF1, AaSCR4, AaSCF7 y AaSCR7 de la casa comercial Applied Biosystems™ propuestos previamente por Kawada *et al* (2009) cuyas secuencias se detallan en el cuadro 1.

La mezcla para la PCR se preparó con el PCR Master Mix 2X de Promega® siguiendo las especificaciones del fabricante. Se adicionó 1.0 µL de cada oligonucleótido a una concentración de 10 µM y 2.0 µL del ADN.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Alemania). Consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C, durante dos minutos y 35 ciclos sucesivos de desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, hibridación a 55 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 30 segundos, así como un paso de elongación final a 72 °C durante 10 minutos (Chaves *et al.*, 2015).

La calidad e integridad de los productos de PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa AMRESCO®, preparado al 1.5% y teñido con Gel red™ (Biotium, Estados Unidos); se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 800 pb con los oligonucleótidos AaSCF1/AaSCR4 y de 700 pb con los oligonucleótidos AaSCF7/AaSCR7. Las muestras amplificadas mediante PCR se almacenaron posteriormente a -20 °C.

2.4. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron a partir de los productos de PCR, empleando los oligonucleótidos AaSCF3, AaSCR6 y AaSCR8 (Applied Biosystems™) también propuestos por Kawada *et al.* (2009) (Cuadro 1).

Los ciclos y temperaturas aplicados sobre las muestras fueron ejecutados por la compañía Macrogen (Korea, <http://foreign.macrogen.co.kr/>) y la secuenciación directa de las muestras se realizó en un analizador genético ABI 3730XL (Applied Biosystems™).

Cuadro 1 Oligonucleotidos utilizados para la identificacion de mutaciones *kdr* en muestras de ADN de *Ae aegypti* y *Ae albopictus*

Codigo	Secuencias	Sitios identificados	Referencia
AaSCF1	5 AGA CAA TGT GGA TCG CTT CC 3	Dominio II Segmento 6	Kawada <i>et al</i> 2009
AaSCR4	5 GGA CGC AAT CTG GCT TGT TA 3	Ser989 Ile1011 Leu1014 y Val1016	
AaSCF7	5 GAG AAC TCG CCG ATG AAC TT 3	Dominio III Segmento 6	Kawada <i>et al</i> 2009
AaSCR7	5 GAC GAC GAA ATC GAA CAG GT 3	Phe1534	
AaSCF3	5 GTG GAA CTT CAC CGA CTT CA 3	Ser989 Ile1011 Leu1014 y	Kawada <i>et al</i> 2009
AaSCR6	5 CGA CTT GAT CCA GTT GGA GA 3	Val1016	Kawada <i>et al</i> 2009
AaSCR8	5 TAG CTT TCA GCG GCT TCT TC 3	Phe1534	Kawada <i>et al</i> 2009

2.5 Analisis de resultados

Los cromatogramas generados se visualizaron con el software BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) la informacion obtenida en formato ABI se transformo a formato FASTA para el analisis pertinente. La autenticidad de las secuencias se corrobora a traves del programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) considerando un porcentaje de identidad mayor al 95%.

Las secuencias se alinearon y editaron con el software MEGA 7.0 (Kumar *et al* 2016). Con el fin de realizar una busqueda minuciosa de las mutaciones *kdr*, el analisis de las secuencias se realizo de forma separada, es decir se agruparon en funcion de los sitios *kdr* amplificados con los tres oligonucleótidos AaSCF3, AaSCR6 y AaSCR8.

Con el propósito de caracterizar de manera general las secuencias del CSDV en las muestras de *Aedes* spp., se calculó la composición nucleotídica porcentual en función de los tres grupos de secuencias analizadas.

Finalmente, para el cálculo de las frecuencias de las mutaciones *kdr*, se tomó en consideración el número de muestras que presentaban cambios puntuales en los sitios *kdr* de interés, en función del total de secuencias analizadas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

1. Identificación de mutaciones *kdr*

Con el objetivo de detectar la presencia de mutaciones *kdr* en muestras de *Aedes*, se secuenció un total de 149 muestras, de las cuales 74 eran muestras de *Ae. aegypti* y 75 de *Ae. albopictus*.

Al emplear tres oligonucleótidos en las reacciones de secuenciación, se obtuvo un total de 447 secuencias; de estas, sólo 194 presentaron una calidad óptima para incluirlas en el análisis.

Cuadro 2. Mutaciones *kdr* detectadas en las muestras de *Aedes* spp. incluidas en el estudio

Dominio	Puntos <i>kdr</i>	N.º de secuencias evaluadas	N.º de secuencias positivas
II	Ser989	78	1
	Ile1011		
	Leu1014		
	Val1016	96	1
III	Phe1534	20	0
Total		194	2

De las 194 secuencias analizadas solo dos presentaron mutaciones a nivel de los sitios *kdr* de interes ambas mutaciones se detectaron a nivel del Dominio II del CSDV (Cuadro 2)

1.1 Caracterización de las secuencias

Con el proposito de caracterizar las secuencias del CSDV en las muestras de *Aedes* spp analizadas se evaluo la composicion nucleotidica porcentual La informacion obtenida se resume en el Cuadro 3

Cuadro 3 Composicion nucleotidica porcentual de las secuencias del CSDV en las muestras de *Aedes* spp incluidas en el estudio

Secuencias analizadas	Composicion nucleotidica			
	Adenina (A)	Timina (T)	Guanina (G)	Citocina (C)
Grupo I AaSCF3	18.6%	30.1%	31.1%	20.2%
Grupo II AaSCR6	16.6%	46.8%	11.3%	25.3%
Grupo III AaSCR8	18.4%	31.2%	20.3%	30.1%

La proporcion de nucleotidos mostro un comportamiento variable en cada uno de los grupos de secuencias analizadas Las secuencias generadas con el oligonucleotido AaSCF3 presentaron un alto porcentaje de Guanina (G) sin embargo las generadas con los oligonucleotidos AaSCR6 y AaSCR8 presentaron un mayor porcentaje de Timina (T) (Cuadro 3)

1.2 Alineación de secuencias con mutaciones *kdr*

A continuación se muestra la alineación múltiple de la secuencia parcial de nucleótidos del gen CSDV en *Ae. aegypti* específicamente de los exones 20 y 21 (Fig. 13 y Fig. 14 respectivamente). Se presenta el contraste de algunas de las secuencias analizadas en el estudio con respecto a secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

	G	E	W	I	E	S	M	W	D	C	M	L	V	G	D	V	S	C	I	P	F	F	L	A	T	V	V	I/M	G	N	L	V																									
Ref. 1	---	G	G	C	G	A	G	T	G	G	A	T	C	C	A	T	G	T	G	G	G	T	G	A	T	G	C	T	T	T	T	T	G	G	C	A	C	G	T	A	G	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A	G	T	A	---		
Ref. 2	---	G	G	C	G	A	G	T	G	G	A	T	C	C	A	T	G	T	G	G	G	T	G	A	T	G	C	T	T	T	T	T	T	G	G	C	A	C	G	T	A	G	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A	G	T	A	---	
Ae079	---	G	G	C	K	A	G	T	G	G	A	T	C	C	A	T	G	T	G	G	G	T	G	A	T	G	C	T	T	T	T	T	T	G	G	C	A	C	G	T	A	G	T	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A	G	T	A	---
Ae060	---	G	G	C	G	A	G	T	G	G	A	T	C	C	A	T	G	T	G	G	G	T	G	A	T	G	C	T	T	T	T	T	T	G	G	C	A	C	G	T	A	G	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A	G	T	A	---	
Ae051	---	G	G	C	G	A	G	T	G	G	A	T	C	C	A	T	G	T	G	G	G	A	C	T	G	T	A	G	C	T	T	T	T	T	G	G	C	A	C	G	T	A	G	T	A	A	G	A	A	T	C	T	A	G	T	A	---

Fig. 13 Sección parcial de la secuencia de nucleótidos del DIIS6 del gen *para* en *Ae. aegypti* (exón 20). Las muestras **Ae079**, **Ae060** y **Ae051** se contrastan con las secuencias de referencia **Ref. 1** (número de acceso NCBI: AB914690.1) y **Ref.2** (número de acceso NCBI: FJ479612.1).

En la muestra Ae079 se observa el cambio del aminoácido isoleucina (Ile) por el aminoácido metionina (Met), el cual es producto de una transición en la tercera base del codón 1011; el codón no mutado es ATA y el mutado es ATG (Fig. 13).

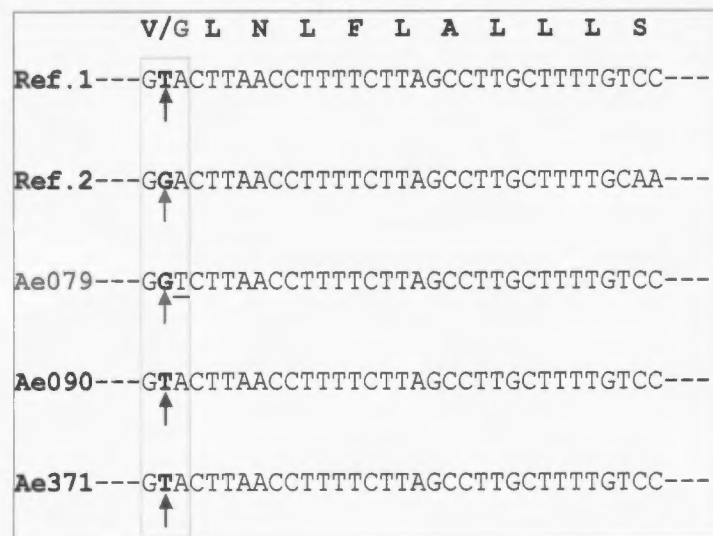


Fig. 14 Sección parcial de la secuencia de nucleótidos del DIIS6 del gen *para* en *Ae. aegypti* (exón 21). Las muestras Ae079, Ae090 y Ae371 se contrastan con las secuencias de referencia Ref. 1 (número de acceso NCBI: AB914690.1) y Ref. 2 (número de acceso NCBI: AB914689.1).

En la posición 1016 de la muestra Ae079 se aprecia el cambio del aminoácido valina (Val) por el aminoácido glicina (Gly), producto de una transversión que ocurre en el nucleótido dos del codón; el codón no mutado es GTA y el mutado GGT. Es importante resaltar que a nivel del tercer nucleótido también ocurre una mutación puntual (A → T), pero de tipo sinónima.

2. Frecuencia de mutaciones *kdr*

La frecuencia de mutaciones *kdr* en las muestras de *Aedes* evaluadas en este estudio fue de 0.01 (1%); como se explicó en el apartado anterior (Cuadro 2, Fig. 13/Fig. 14), sólo se detectaron mutaciones a nivel de dos de los cinco puntos *kdr* de interés.

En el Cuadro 4 se presenta la distribución de muestras positivas, en función de la especie de *Aedes* estudiada y de la localidad de la cual proceden las muestras.

Cuadro 4. Número de muestras de *Aedes* spp. con mutaciones *kdr*, según localidad de procedencia

Especie	Localidad				
	Bethania	Garzas de Pacora	Nuevo Chorrillo	Princesa Mía	Lluvia de Oro
<i>Aedes aegypti</i>	0/26 (0)	0/5 (0)	1/19 (0.01*)	0/5 (0)	0/19 (0)
<i>Aedes albopictus</i>	0/4 (0)	0/2 (0)	0/65 (0)	0/0 (0)	0/4 (0)

* Porcentaje calculado en función del total de muestras de *Ae. aegypti* evaluadas

Tanto la mutación Ile1011Met como la mutación Val1016Gly, se detectaron en una muestra de *Ae. aegypti* proveniente de la comunidad de Nuevo Chorrillo.

CAPITULO IV

DISCUSION

El control de *Aedes* sigue siendo un medio crucial para reducir los indices de transmision de las arbovirosis Dengue fiebre Chikungunya, fiebre amarilla y la enfermedad por Zika actualmente las estrategias para el control de este vector en Panama se basan en la eliminaci3n de los criaderos de larvas y en el uso de insecticidas quimicos (OPS 2014)

Durante los ultimos a1os tanto *Ae aegypti* como *Ae albopictus* han manifestado una marcada habilidad para desarrollar resistencia frente a insecticidas impactando de forma negativa los esfuerzos para su control (Bariami *et al* 2012 Smith *et al* 2016)

Pese a que informes recientes sugieren que las poblaciones paname1as de *Ae aegypti* son en terminos generales susceptibles a los plaguicidas comerciales se ha puesto de manifiesto la existencia de poblaciones de vectores que muestran niveles moderados de resistencia a la deltametrina en el pais lo que indica el potencial para una futura diseminaci3n de estos genotipos resistentes de no existir un manejo adecuado por parte del programa de control vectorial (Caceres *et al* 2013)

La frecuencia de mutaciones *kdr* en las muestras analizadas fue baja (1%) en comparación con lo reportado en estudios realizados en la región, en los cuales sí ha sido posible detectar mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a insecticidas piretroides.

Por ejemplo, en Colombia se realizó un estudio para identificar el alelo *kdr* 1016Ile en cuatro poblaciones de *Ae. aegypti*, a través de la técnica PCR alelo específico (PCR-AS). Del total de individuos genotipados sólo un 6% resultó ser heterocigoto (Val/Ile), por lo que la frecuencia del alelo 1016Ile manifestó una frecuencia sumamente baja en las poblaciones (Aguirre-Obando *et al.*, 2015).

En Venezuela, también mediante la técnica PCR-AS, fue posible detectar la presencia del alelo 1016Ile en poblaciones de *Ae. aegypti* sometidas a bioensayos de resistencia con deltametrina. El estudio reflejó que el genotipo heterocigoto Val1016/Ile1016 estuvo presente en una proporción importante en los mosquitos que manifestaron el fenotipo resistente (Álvarez González *et al.*, 2014).

Posteriormente también en Venezuela, se realizó un estudio para determinar la frecuencia de los alelos Ile1016 y Cys1534 en poblaciones naturales de *Ae. Aegypti* mediante la técnica de PCR en tiempo real. El estudio, que incluyó también una cepa seleccionada durante 15 generaciones con deltametrina, demostró que las frecuencias del alelo 1534Cys en las poblaciones naturales son superiores que las del alelo 1016Ile y que la selección del alelo 1534Cys por presión con deltametrina ocurrió más rápido que en el alelo 1016Ile (Alvarez *et al.*, 2015).

En cepas resistentes de *Ae. aegypti* provenientes de la región del Caribe se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones *kdr*; por ejemplo, la secuenciación parcial del gen del CSDV de la cepa CAYMAN permitió identificar que el alelo *kdr* 1016Ile exhibía una frecuencia de 0.79 y el alelo 1534Cys una frecuencia de 0.68 (Harris *et al.*, 2010). En tanto, el análisis de genotipado de la cepa CUBA-DELTA reflejó una frecuencia de 0.51 para el alelo 1016I y 0.88 para el alelo 1534C (Bariami *et al.*, 2012).

En el municipio de Jacarezinho, en Brasil, se realizó un estudio para evaluar cambios potenciales de la resistencia a insecticidas en poblaciones naturales de *Ae. aegypti*, después de intervenciones de control químico aplicadas durante un brote epidémico de Dengue ocurrido en el 2010. Las pruebas moleculares realizados en muestras colectadas durante los años 2011 y 2012 demostraron una alta frecuencia de la mutación Val1016Ile; la cual, según los autores, puede sufrir una expansión como resultado de la aplicación continua de insecticidas piretroides (Aguirre-Obando *et al.*, 2016).

Otro estudio llevado a cabo en Brasil reveló patrones de distribución regional de las mutaciones *kdr* circunscritas a las posiciones Val1016 y Phe1534 en especímenes de *Ae. aegypti* colectados durante el transcurso de 10 años. Según los investigadores la presión de selección diferencial no explicaría la regionalización de los alelos *kdr*, al contrario, la distribución de las mutaciones reflejaría diferencias en las poblaciones de *Ae. aegypti* que colonizaron el continente por lo que el análisis de loci neutrales permitiría dilucidar las vías evolutivas de estos genes de resistencia (Linss *et al.*, 2014).

Con respecto a nuestros resultados, sólo fue posible detectar mutaciones *kdr* en muestras de *Aedes* de una misma localidad. Probablemente el análisis de especímenes de otras localidades permitirá a futuro realizar inferencias en torno a si existe algún patrón de distribución de dichas mutaciones en las poblaciones del vector.

En nuestra investigación no fue posible detectar mutaciones *kdr* en las secuencias de *Ae. albopictus*, hecho que puede estar relacionado a factores tanto técnicos (debido a la calidad de secuencias obtenidas) así como a factores inherentes a los especímenes. Es importante resaltar que, de las 194 secuencias evaluadas, tan sólo 20 resultaron tener una calidad óptima para identificar cambios puntuales a nivel del DIIS6 del CSDV, región donde ha sido posible caracterizar la mutación Phe1534Cys.

En un estudio realizado con una población natural de *Ae. albopictus* en Costa Rica, no se encontraron alelos mutantes asociados con la resistencia *kdr*, sólo se detectó la presencia de una mutación sinónima a nivel del locus Val1016; dicho comportamiento fue atribuido a la reciente invasión de esta especie en ese país (Chaves *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, el establecimiento de las poblaciones de *Ae. albopictus* en Panamá es relativamente reciente en comparación con *Ae. aegypti*, por ende, el no haber detectado mutaciones de tipo *kdr* en las muestras de *Ae. albopictus* lleva a pensar que puede deberse a que el control químico con insecticidas aún no ha ejercido presión sobre las poblaciones de este vector.

A diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación, así como a los obtenidos en Costa Rica, en poblaciones de *Ae. albopictus* de otras latitudes ha sido posible detectar particularmente la mutación Phe1534Cys. En un estudio llevado a cabo en Singapur, a través de una genotipado por secuenciación, se detectó que el 92.3% de los mosquitos exhibían la mutación Phe1534Cys; estimando así una frecuencia de 73.1% para el alelo Cys1534 (Kasai *et al.*, 2011).

Marcombe *et al.* (2014), llevaron a cabo un estudio con poblaciones de *Ae. albopictus* de Estados Unidos en el cual lograron identificar el polimorfismo Phe1534Leu en el dominio III del CSDV. A pesar de que dicho polimorfismo no se había reportado para esta especie, su localización ya había sido relacionada con la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*.

Recientemente Xu *et al.* (2016), evaluaron especímenes de *Ae. albopictus* de 12 poblaciones procedentes de Asia, África, América y Europa, logrando detectar dos nuevas mutaciones *kdr* a nivel del dominio III del CSDV, la mutación Ile1532Thr y la Phe1534Ser; particularmente con la mutación Phe1534Ser, además de ser abundante, fue posible establecer una asociación positiva significativa con la resistencia a la deltametrina.

Ante el panorama antes contrastado, es importante resaltar que la resistencia es considerada una adaptación evolutiva reciente en los insectos, la cual ha ocurrido en menos de un siglo en respuesta a las aplicaciones secuenciales de insecticidas químicos.

La aparición de la resistencia no sólo acorta la vida útil de los insecticidas disponibles actualmente, sino que también mitiga la eficacia de los insecticidas recién descubiertos o desarrollados, debido a mecanismos de resistencia múltiple y resistencia cruzada. (Karunamoorthi & Sabesan, 2013)

El estudio de la resistencia a insecticidas en poblaciones de *Aedes* provenientes de campo es necesario para determinar los niveles, mecanismos y distribución geográfica de la misma, a fin de seleccionar insecticidas apropiados para el control del vector. Cambios en el estado de susceptibilidad deberían también dirigir políticas y decisiones operacionales ya que las decisiones basadas en evidencia aseguran la selección y uso de insecticidas efectivos (Bisset *et al.*, 2003; WHO, 2016).

Adicional al monitoreo de la resistencia a insecticidas, la adopción de procesos estandarizados para la evaluación de la resistencia, la publicación de resultados a través de bases de datos centralizadas y la caracterización de biomarcadores para comprender la resistencia, son acciones esenciales para comprender el progreso, retos y éxito en el control de enfermedades transmitidas por vectores (Bonizzoni *et al.*, 2013; Karunamoorthi & Sabesan, 2013; Ranson *et al.*, 2010; Vontas *et al.*, 2012).

La implementación de medidas para la detección oportuna de la resistencia es importante para los programas de control de vectores debido a que facilita la selección de insecticidas apropiados, permite comprobar la condición de susceptibilidad en las poblaciones de vectores y la eficacia de los insecticidas en uso; facilita también la

inclusión de otros métodos de control complementarios y el manejo de la resistencia en sí (Cáceres, 2013; Karunamoorthi & Sabesan, 2013).

Generalmente, las técnicas de vigilancia y monitoreo de resistencia implican las siguientes acciones: uso de bioensayos de susceptibilidad para larvas y mosquitos adultos normados por la OMS, bioensayos con botellas impregnadas con insecticidas de acuerdo a la técnica normada por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) y pruebas biológicas de campo (OPS, 2014). Actualmente las pruebas moleculares también son empleadas para monitorear el desarrollo de resistencia en poblaciones de insectos de importancia médica.

En las pruebas de susceptibilidad los mosquitos son expuestos a concentraciones fijadas de insecticida con el fin de registrar los niveles de mortalidad, la cual es expresada como el porcentaje de mosquitos derribados ya sea vivos o muertos. La prueba de susceptibilidad requiere muestras de al menos 100 mosquitos vivos por sitio de muestreo (WHO, 2012). En tanto, con los ensayos bioquímicos se busca detectar la presencia de un mecanismo de resistencia particular o el incremento de la actividad de una enzima y al igual que los bioensayos o pruebas de susceptibilidad, se requiere contar con muestras de mosquitos frescas (WHO, 2012).

Una de las limitantes de las pruebas de susceptibilidad es que a pesar de que detecta la existencia de resistencia, no es posible identificar el mecanismo de resistencia involucrado; además, si la frecuencia de la resistencia es muy baja tampoco puede ser

detectada. En cuanto a las pruebas bioquímicas, éstas resultan difícil para aplicar en el campo debido al requerimiento de equipos sofisticados, así como de la experticia técnica para interpretar los resultados; adicional, existe cierta inconsistencia en cuanto a la definición de la correlación existente entre las reacciones químicas de la prueba y la habilidad incrementada para metabolizar los insecticidas (WHO, 2012).

Las pruebas moleculares por su parte permiten un análisis detallado y directo de genes implicados en la resistencia, incluso algunos métodos avanzados pueden brindar información genética compleja sobre si las mutaciones que confieren resistencia corresponden a un carácter de sólo algunos especímenes o se encuentran diseminadas en toda la población. A pesar de ser pruebas precisas para detectar y medir la frecuencia de la resistencia en las poblaciones de vectores, requieren el uso de equipos costosos y se sugiere que las mismas sean complementadas con bioensayos de susceptibilidad (WHO, 2012).

En Panamá, la detección de mecanismos asociados a la resistencia a insecticidas se lleva cabo en el ICGES, a través del Laboratorio de Vigilancia y Monitoreo de la Resistencia a Insecticidas en Insectos de Importancia en Salud Pública (LAMRE); por medio de la aplicación de pruebas bioquímicas, uso de agentes sinérgicos y pruebas electroforéticas. Este laboratorio evalúa la resistencia metabólica que puedan manifestar las poblaciones de insectos vectores de importancia médica y funciona como referencia nacional para las actividades que realiza el Programa de Control de Vectores del MINSA (OPS, 2014).

Al ser los insecticidas compuestos tóxicos para la naturaleza, deben ser empleados cuidadosamente y no de manera deliberada o indiscriminada; de hecho, los programas de control de vectores deben garantizar la calidad en términos de minimizar la presión de selección a insecticidas en áreas no endémicas, lo cual puede reducir considerablemente los costos operacionales. El monitoreo de la resistencia a insecticidas, la información de la densidad de mosquitos adultos, los índices de larvas y pupas, así como aspectos de carácter ecológico, constituyen una parte esencial de la vigilancia entomológica, la cual permite el desarrollo de respuestas apropiadas para prevenir y controlar arbovirosis como el Dengue (WHO, 2016, 2012).

Slosek (1986) menciona dos cambios significativos en el pasado reciente de las poblaciones de *Ae. aegypti* en las Américas. El primero corresponde a la alteración de los patrones de distribución del mosquito, debido a los intentos de erradicación implementados a inicio de 1900 para el control de la fiebre amarilla; la distribución del mosquito continuó inestable debido a que áreas que habían sido declaradas libre de mosquitos eran sujetas a reinfestación a causa de la persistencia de poblaciones de *Ae. aegypti* en otros lugares. El segundo cambio radicó en el incremento de la habilidad del mosquito para resistir la erradicación química; por ejemplo, las poblaciones de *Aedes* en el Caribe iniciaron a mostrar resistencia a insecticidas organoclorados desde la década de 1950.

Básicamente el éxito de las primeras campañas de erradicación del *Aedes*, desarrolladas durante los años cincuenta y sesenta, se debió principalmente a la voluntad política

existente lo que favoreció la implementación de la estrategia de erradicación reflejadas a través de un financiamiento para la adquisición de personal insecticidas y equipos. Se resalta además la importancia en la reducción de las fuentes de reproducción del vector, el desarrollo y aplicación de políticas para el uso adecuado de los insecticidas, así como una gestión vertical centralizada y bien organizada del programa (San Martín & Brathwaite Dick 2007).

El deterioro del programa de erradicación del *Ae. aegypti* implementado por la OPS llevó al incremento de la densidad del vector y a la expansión de su distribución geográfica desde los años 70. La disminución de la vigilancia entomológica al punto que las reinfestaciones no eran detectadas, la estructura centralizada de los programas y la pérdida del interés de la clase política en países que habían logrado la erradicación resultó en una lenta respuesta frente a las reinfestaciones (Dick *et al.* 2012, San Martín *et al.* 2010).

Factores como el crecimiento poblacional, la urbanización no planificada en condiciones sanitarias pobres, fallas en la infraestructura de salud pública, la disminución del acceso de salud, la poca participación comunitaria, han contribuido al deterioro del programa de erradicación y por ende al incremento del Dengue. De hecho, la globalización de la economía, los viajes internacionales y el cambio climático podrían también explicar la expansión de esta arbovirosis (Dick *et al.* 2012, San Martín *et al.* 2010).

Una problemática persistente que enfrenta el Programa de Control del *Aedes* en Panamá,

que es consistente a la situación que ocurre en otros países, es la falta de participación y compromiso social y comunitario con las actividades de saneamiento de predios, la disposición adecuada de los desechos, así como la eliminación de criaderos potenciales de los vectores. Otra situación que afecta negativamente las actividades para el control del *Aedes* es la carencia de recurso humano especializado para realizar una labor de vigilancia entomológica lo suficientemente abarcadora (G. Ruíz, comunicación personal, 27 de abril de 2017).

Ante el incremento del número de casos y la incidencia de Dengue en la región de las Américas, la OPS aprobó en el año 2003 la adopción de la Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del Dengue (EGI-Dengue). La EGI está basada en un modelo consistente en seis componentes: epidemiología, entomología, atención al paciente, laboratorio, comunicación social y medio ambiente. Al 2010, 19 países habían implementado el EGI-Dengue, incluyendo a Panamá. Por otro lado, en el 2008 se conformó la Red de Laboratorios de Dengue de Las Américas (RELDA), componente clave para el fortalecimiento de las capacidades técnico-científicas de los laboratorios de la Región (Dick *et al.*, 2012).

Actualmente, en todas las Regiones de Salud del país funciona un Grupo técnico de la EGI-Dengue, el cual en función de la situación epidemiológica toma decisiones sobre cómo abordar integralmente el problema del Dengue. El Departamento de Control de Vectores mantiene una participación activa dentro del Grupo técnico de la EGI-Dengue que opera a nivel nacional (G. Ruíz, comunicación personal, 27 de abril de 2017).

En Panamá también se ha evaluado la factibilidad de aplicar estrategias alternativas para el control de las poblaciones de *Aedes*. En el 2014, por ejemplo, el ICGES en conjunto con la empresa Oxitec llevaron a cabo un estudio piloto de liberación de mosquitos transgénicos OX513A. El proyecto realizado en la comunidad de Nuevo Chorrillo (Arraiján) arrojó resultados satisfactorios, al reducir en un 90% la densidad de las poblaciones locales del vector (Gorman *et al.*, 2016).

El control de los insectos vectores puede diferir entre países e incluso entre regiones de un mismo país; por ende, debe ser seleccionado con cautela, considerando las herramientas entomológicas existentes, como: situación de susceptibilidad, dinámica poblacional, capacidad vectorial, preferencias de alimentación, así como la temporada alta de transmisión de las enfermedades por los vectores locales (Karunamoorthi & Sabesan, 2013).

Este estudio tenía como fin explorar la presencia de mutaciones *kdr* en muestras de mosquitos *Aedes* provenientes del campo por medio del empleo de herramientas moleculares, de manera tal que se tuviese un panorama general del estado de las poblaciones del vector con respecto a la resistencia a insecticidas piretroides.

La baja frecuencia de mutaciones *kdr* detectadas en las muestras de *Aedes* puede ser indicativo que las poblaciones de este vector, a pesar de que han estado expuestas a insecticidas piretroides hace más de 30 años, no han experimentado un proceso de fijación de estos cambios genéticos. Probablemente, las actividades de control químico

han ejercido un efecto positivo en cuanto al control de la densidad del vector sin ejercer una presión que conduzca a manifestar una resistencia generalizada.

Entre los principales factores que influyen en el desarrollo de la resistencia a insecticidas figuran: la frecuencia de aplicación del insecticida, la dosis y el efecto de persistencia del mismo, la tasa de reproducción de los insectos y el aislamiento de las poblaciones (IRAC, 2011; Naqqash *et al.*, 2016). Según Cáceres *et al.* (2013), la resistencia en poblaciones de mosquitos vectores está condicionada por la selección del insecticida, la presión selectiva ejercida por estos, así como factores biológicos, genéticos y operacionales.

La resistencia se produce cuando mutaciones genéticas naturales provocan que una pequeña proporción de la población resista y sobreviva a los efectos del pesticida. Si esta ventaja se mantiene mediante el uso continuo del mismo plaguicida, los organismos resistentes se reproducirán y los cambios genéticos que causan resistencia se transferirán de los padres a la descendencia. A través de este *proceso de selección*, los organismos resistentes eventualmente se hacen numerosos y el control por el pesticida puede fallar (FAO, 2012).

Los genes de resistencia pueden comportarse en una condición dominante, heterocigota o recesiva. Si el gen se exhibe de forma dominante o heterocigota, solo un progenitor requiere tener la característica para que la misma se exprese parcial o completamente; si es recesivo, ambos progenitores deben poseer este rasgo. Afortunadamente, la mayoría de los mecanismos de resistencia, por ejemplo, la resistencia *kdr*, son controlados por

genes recesivos o semi-dominantes, que se distribuyen lentamente dentro de la población. Si la resistencia es genéticamente dominante, esta puede establecerse rápidamente dentro de la población y ser difícil de manejar (IRAC, 2011).

Es importante resaltar que la resistencia es un proceso que no evoluciona a la misma proporción en las especies o en las poblaciones (Karunamoorthi & Sabesan, 2013). Puede desarrollarse rápidamente en algunas especies y lentamente en otras; incluso en una misma especie, bajo ciertas circunstancias, la resistencia se desarrolla de manera rápida y, bajo otras circunstancias, de forma lenta o incluso no llega a manifestarse (Cáceres *et al.*, 2013).

La asociación entre las mutaciones que ocurren a nivel del gen CSDV y la consecuente resistencia frente a insecticidas piretroides ha sido previamente estudiada en poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de Latino América. Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007), realizaron bioensayos con la descendencia F3 de cepas de *Ae. aegypti* procedente de padres homocigotos Val1016 susceptibles a la permetrina y padres homocigotos Ile1016 resistentes a la permetrina. Los resultados indicaron que el alelo 1016 Ile se segrega como un alelo recesivo al conferir resistencia *kdr*. Además, los análisis de segregación entre los alelos de los codones 1011 y 1016 sugieren una alta tasa de recombinación, a pesar de que sólo están separados por un intrón de aproximadamente 250 pb.

A pesar de que algunos estudios sobre resistencia a piretroides desarrollados en mosquitos adultos no se apoyan en la realización de bioensayos de susceptibilidad, la

detección de la mutación Val1016Ile en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* por ejemplo tiene consecuencias desfavorables con respecto al uso continuo de este tipo de insecticida (Aguirre Obando *et al.* 2016). Estudios controlados sobre la presión de selección con insecticidas piretroides han documentado que tan solo después de cinco generaciones se da la fijación del alelo *kdr* Ile1016 (Saavedra Rodríguez *et al.* 2012).

El concepto de punto de inflexión describe el hecho de que la resistencia puede ocurrir a una frecuencia baja, pero que incrementa gradualmente en la población del vector durante muchos años sin ser detectada. Sin embargo, cuando la resistencia alcanza el punto de inflexión, puede incrementar extremadamente rápido. Por ejemplo, un gen de resistencia inicial con una frecuencia inicial de 1 en 1 millón puede duplicar en frecuencia durante mucho tiempo antes de que alcance el 1% y se haga entonces detectable dentro de la población. A ese punto, teóricamente, solo otras seis generaciones de duplicación de frecuencias de genes de resistencia son necesarias antes que la resistencia alcance una frecuencia del 50% (WHO 2012).

El hallazgo de las mutaciones Ile1011Met y Val1016Gly en especímenes de *Ae. aegypti* que no habían sido expuestos previamente a bioensayos de resistencia constituye un indicio de que las poblaciones naturales de este vector, aunque en una proporción baja, están exhibiendo un rasgo que en un momento dado puede llevarlas a manifestar resistencia frente a insecticidas piretroides.

El determinar la distribución de estas y otras mutaciones *kdr* en poblaciones de *Ae*

aegypti o en otras especies de mosquitos vectores presentes en Panamá, requiere sin duda alguna un mayor esfuerzo de muestreo y una adecuación de la metodología empleada en esta investigación. La información que se genere sería de gran valor para determinar la frecuencia de los alelos mutantes, evaluar si las mutaciones se encuentran en un proceso de fijación e indagar sobre el estado evolutivo de la resistencia a los insecticidas.

CONCLUSIONES

- Esta investigación ha permitido detectar dos mutaciones a nivel del gen del CSDV en muestras de *Aedes*, incriminadas en el desarrollo de la resistencia a insecticidas piretroides.
- Las mutaciones *kdr* encontradas (Ile1011Met y Val1016Gly) fueron detectadas en especímenes de *Ae. aegypti* provenientes de la comunidad de Nuevo Chorrillo.
- La frecuencia de mutaciones *kdr* en las muestras analizadas fue baja (1%), en comparación con lo reportado en estudios realizados en la región.
- La baja frecuencia de mutaciones *kdr* detectadas en esta investigación puede ser indicativo que las poblaciones de este vector aún no han experimentado un proceso de fijación de estos cambios genéticos.
- El hallazgo de las mutaciones Ile1011Met y Val1016Gly en especímenes de *Ae. aegypti* no expuestos a bioensayos de resistencia constituye un indicio de que las poblaciones naturales de este vector, aunque en una proporción baja, están exhibiendo un rasgo que en un momento dado puede llevarlas a manifestar

resistencia

- En esta investigación queda demostrada la factibilidad de incorporar técnicas moleculares para la detección y monitoreo de la resistencia frente a insecticidas en especies de mosquitos de importancia médica

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la realizacion de estudios que incorporen tanto el uso de bioensayos de resistencia como de pruebas moleculares a fin de identificar rasgos fenotipicos y genotipicos inherentes a la resistencia frente a insecticidas en poblaciones de insectos de importancia medica
- Se requiere llevar a cabo estudios mas abarcadores que tomen en consideracion un numero mayor de muestras y la adecuacion de algunos aspectos metodologicos De esta manera seria posible evaluar la distribucion de otros genes implicados en el desarrollo de la resistencia al mismo tiempo se exploraria la evolucion y estado de dicho rasgo en las poblaciones panameñas de *Aedes*

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adames, A.J. & Galindo, P. (1999). Clave genérica para la identificación de las hembras de mosquitos de Panamá. *Scenia*, 14(1), 9-16.
- Aguirre-Obando, O. A., Bona, A. C. D., Duque, J. E., & Navarro-Silva, M. A. (2015). Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia*, 32(1), 14–22. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702015000100003>.
- Aguirre-Obando, O. A., Pietrobon, A. J., Bona, A. C. D., & Navarro-Silva, M. A. (2016). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. *Revista Brasileira de Entomologia*, 60(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.11.009>.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 59, 205–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162002>.
- Alvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodriguez, K., Lopez, B., & Flores, A. E. (2015). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*, 71(6), 863–869. <https://doi.org/10.1002/ps.3846>.
- Álvarez González., L., Ponce García, G., Oviedo, M., Briceño, A., & Flores Suarez, A. E. (2014). Mecanismos asociados a la resistencia al derribo “kdr” a la deltametrina en *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 54(1), 58–67.
- Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., & Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review. *Pest Management Science*, 71(11), 1471–1485. <https://doi.org/10.1002/ps.4044>.
- Bariami, V., Jones, C. M., Poupardin, R., Vontas, J., & Ranson, H. (2012). Gene amplification, abc transporters and cytochrome p450s: Unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the Dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001692>.

- Bhatt S Gething P W Brady O J Messina J P Farlow A W Moyes C L Drake J M Brownstein J S Hoen A G Sankoh O Myers M F George D B Jaenisch T William G R Simmons C P Scott T W Farrar J & Hay S (2013) The global distribution and burden of Dengue *Nature* 496(7446) 504–507 <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bisset J A Rodriguez M M & Caceres L (2003) Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panama *Revista Cubana de Medicina Tropical* 55(3) 191–195 Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601999000200004&lng=es&nrm=iso&tling=es
- Bisset J A Rodriguez M M French L Severson D W Gutierrez G Hurtado D & Fuentes I (2014) Insecticide Resistance and Metabolic Mechanisms Involved in Larval and Adult Stages of *Aedes aegypti* Insecticide Resistant Reference Strains from Cuba *Journal of the American Mosquito Control Association* 30(4) 298–304 <https://doi.org/10.2987/14.6431.1>
- Boeuf P Drummer H E Richards J S Scoullar M J L & Beeson J G (2016) The global threat of Zika virus to pregnancy epidemiology clinical perspectives mechanisms and impact *BMC Medicine* 14(1) 112 <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0660-0>
- Bonizzoni M Gasperi G Chen X & James A A (2013) The invasive mosquito species *Aedes albopictus* Current knowledge and future perspectives *Trends in Parasitology* 29(9) 460–468 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- Brengues C Hawkes N J Chandre F McCarroll L Duchon S Guillet P Manguin S Morgan J C & Hemingway J (2003) Pyrethroid and DDT cross resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage gated sodium channel gene *Medical and Veterinary Entomology* 17 87–94 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x>
- Brito L P Linss J G B Lima Camara, T N Belinato T A Peixoto A A Lima, J B P Valle D & Martins A J (2013) Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost *PLoS ONE* 8(4) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060878>
- Brown J E Evans B R Zheng W Obas V Barrera Martinez L Egizi A Zhao H Caccone A & Powell J R (2014) Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti* the Dengue and yellow fever mosquito *Evolution* 68(2) 514–525 <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Caceres L (2013) Determinacion de la Resistencia a Insecticidas y sus Mecanismos en Poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) en algunos paises de America

- Caceres L, Rovira, J, Garcia, A, Torres R & Cruz M D La (2013) Determinacion de la sensibilidad a insecticidas organofosforados carbamatos y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus 1762 (Diptera Culicidae) de Panama *Biomedica* 33 70–81 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.703>
- Caceres L (1999) *La lucha antimalarica y el desarrollo de la resistencia del Anopheles albimanus a los insecticidas en Panama* J Jenkins (Ed) Panama Republica de Panama PRAGSALUD
- Carrera, J P, Diaz Y, Denis B, Barahona de Mosca, I, Rodriguez D, Cedeño I, Arauz D, Gonzalez P, Cerezo L, Moreno L, Garcia, L, Saenz L E, Atencio M A, Rojas Fermin E, Vizcaino F, Perez N, Moreno B, Lopez Verges S, Valderrama A & Armien B (2017) Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas the Panamanian experience *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(2) e0005338 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005338>
- Catterall W A (2000) From Ionic Currents to Molecular Mechanisms The Structure and Function of Voltage Gated Sodium Channels *Neuron* 26 13–25 [https://doi.org/10.1016/S0896.6273\(00\)81133.2](https://doi.org/10.1016/S0896.6273(00)81133.2)
- Chang C, Shen W K, Wang T T, Lin Y H, Hsu E L & Dai S M (2009) A novel amino acid substitution in a voltage gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti* *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(4) 272–278 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.01.001>
- Chaves L F, Kawashima, E, Futami K, Minakawa, N & Rodriguez R M (2015) Lack of kdr mutations in a population of Asian tiger mosquitoes from Costa Rica *Bulletin of Insectology* 68(1) 61–63
- Clark Gil S & Darsie R F (1983) The mosquitoes of Guatemala *Mosquito Systematics* 13(3) 151–284
- Contigiani M, Diaz L A & Spinsanti L I (2017) General Aspects on Arboviruses In C B Marcondes (Ed) *Arthropod Borne Diseases* (p 642) Suiza Springer International Publishing <https://doi.org/10.1007/978.3.319.13884.8>
- Courtney K O (1950) Report on the Recent Outbreak of Jungle Yellow Fever in Panama *American Journal of Public Health and the Nation's Health* 40(4) 417–426 <https://doi.org/10.2105/AJPH.40.4.417>
- David J P, Ismail H M, Chandor Proust, A & Paine M J I (2013) Role of cytochrome P450s in insecticide resistance impact on the control of mosquito borne diseases and use of insecticides on Earth *Philosophical Transactions of the Royal*

Society B Biological Sciences 368(1612) 20120429
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>

Dick O B San Martin J L Montoya R H Del Diego J Zambrano B & Dayan G H (2012) Review The history of Dengue outbreaks in the Americas *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(4) 584–593
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11.0770>

Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance *Invertebrate Neuroscience* 7(1) 17–30 <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9>

Dong K Du Y Rinkevich F Nomura, Y Xu P Wang L Silver K & Zhorov B S (2014) Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50(1) 1–17
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>

Donnelly M J Corbel V Weetman D Wilding C S Williamson M S & Black IV W C (2009) Does kdr genotype predict insecticide resistance phenotype in mosquitoes? *Trends in Parasitology* 25(5) 213–219
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.007>

Du Y Nomura, Y Liu Z Yang Z Y & Dong K (2009) Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels *Journal of Biological Chemistry* 284(49) 33869–33875 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045690>

Du Y Nomura, Y Satar G Hu Z Nauen R He S Y Zhorov B & Dong K (2013) Molecular evidence for dual pyrethroid receptor sites on a mosquito sodium channel *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(29) 11785–90 <https://doi.org/10.1073/pnas.1305118110>

Eldridge B F (2008) *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas a review of their interactions with the human population

Field L M Emyr Davies T G O Reilly A O Williamson M S & Wallace B A (2017) Voltage gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides *European Biophysics Journal* <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1195-1>

Figueroa, D P Scott S Hamilton West C Gonzalez C R & Canals M (2015) Mosquitoes disease vectors in context of climate change in Chile *Revista de Parasitologia Latinoamericana* 64(2) 30–40

FAO (2012) *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides Guidelines for Prevention and Management of Pesticides Resistance* FAO Retrieved from http://www.who.int/whopes/resources/resources_2010/en/

Florida Medical Entomology Laboratory *Essential Information on the ZIKA Virus*
[Imagen en línea] Recuperada el 3 de mayo 2017 de
http://fmel.ifas.ufl.edu/media/fmelifasufledu/images/aegypti_albo3_1035x613.jpg

Futami K, Valderrama, A, Baldi M, Minakawa, N, Rodriguez R M & Chaves L F
(2015) New and common haplotypes shape genetic diversity in asian tiger mosquito
populations from Costa Rica and Panama *Journal of Economic Entomology* 108(2)
761–768 <https://doi.org/10.1093/jee/tou028>

Garcia G P, Flores A E, Fernandez Salas I, Saavedra Rodriguez K, Reyes Solis
G, Lozano Fuentes S, Bond J G, Casas Martinez M, Ramsey J M, Garcia
Rejon J, Dominguez Galera, M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L & Black
IV W C (2009) Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in
Aedes aegypti in Mexico *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(10)
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531>

Gatherer D & Kohl A (2016) Zika virus: A previously slow pandemic spreads rapidly
through the Americas *Journal of General Virology* 97(2) 269–273
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000381>

Gonzales K K, Tsujimoto H & Hansen I A (2015) Blood serum and BSA but
neither red blood cells nor hemoglobin can support vitellogenesis and egg
production in the Dengue vector *Aedes aegypti* *PeerJ* 3 e938–e938
<https://doi.org/10.7717/peerj.938>

Gorgas W C (1915) *Sanitation in Panama* D Appleton and Company New York &
London

Gorman K, Young J, Pineda, L, Marquez R, Sosa N, Bernal D, Torres R, Soto
Y, Lacroix R, Naish N, Kaiser P, Tepedino K, Philips G, Kosmann C &
Caceres L (2016) Short term suppression of *Aedes aegypti* using genetic control
does not facilitate *Aedes albopictus* *Pest Management Science* 72(3) 618–628
<https://doi.org/10.1002/ps.4151>

Grard G, Caron M, Mombo I M, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, Fontenille
D, Paupy C & Leroy E M (2014) Zika Virus in Gabon (Central Africa) 2007
A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(2) 1–6
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>

Hall T (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and
analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series*
<https://doi.org/citeulike:article:691774>

Harris A F, Rajatileka, S & Ranson H (2010) Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*
from Grand Cayman *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83(2)

277–284 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09.0623>

Hemingway J & Ranson H (2000) Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease *Annual Review of Entomology* 45 371–391

Huang Y J Higgs S & Vanlandingham D (2017) Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses *Insects* 8(1) 21
<https://doi.org/10.3390/insects8010021>

INEC (2010) *Censo de Poblacion y Vivienda de 2010* Panama Instituto Nacional de Estadística y Censo Contraloría General de la República de Panama

IRAC (2011) Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance *Insecticide Resistance Action Committee*
<https://doi.org/10.1039/b308501p>

Iturbe Ormaetxe I Walker T & O'Neill S L (2011) Wolbachia and the biological control of mosquito borne disease *EMBO Reports* 12(6) 508–518
<https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>

Julo Reminiac J E Tran P V Nguyen Y T Nguyen T Vu D B Hoang D M Nguyen L H Vu T T Vu N S Do L D & Brey P T (2014) Validation of Mesocyclops (Copepoda) and community participation as an effective combination for Dengue control in Northern Vietnam *Field Actions Science Reports The journal of field actions* 7 0–9

Karunamoorthi K & Sabesan S (2013) Insecticide Resistance in Insect Vectors of Disease with Special Reference to Mosquitoes A Potential Threat to Global Public Health *Health Scope International Quarterly Journal* 2(1) 4–18
<https://doi.org/10.5812/jhs.9840>

Kasai S Ng L C Lam Phua, S G Tang C S Itokawa, K Komagata, O Kobayashi M & Tomita, T (2011) First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector *Aedes albopictus* *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64(3) 217–221

Kawada, H Higa, Y Komagata, O Kasai S Tomita, T Nguyen T Y Loan L L Sanchez R A P & Takagi M (2009) Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage gated sodium channel in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(10) 1–7
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000527>

Kraemer M U G Sinka, M E Duda, K A Mylne A Q N Shearer F M Barker C M Moore C G Carvalho R G Coelho G E Bortel W V Hendrickx G Schaffner F Elyazar I R F Teng H Brady O J Messina, J P Pigott D M

- Scott T W Smith D L Wint G R W Golding N & Hay S I (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* *eLife* 4 1–18 <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kumar S Stecher G & Tamura, K (2016) MEGA7 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets *Molecular Biology and Evolution* 33(7) 1870–1874 <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kushwah R B S Dykes C L Kapoor N Adak T & Singh O P (2015) Pyrethroid Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations F1534C and a Novel Mutation T1520I in Indian *Aedes aegypti* *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(1) <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003332>
- Lees R S Gilles J R Hendrichs J Vreysen M J & Bourtzis K (2015) Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors *Current Opinion in Insect Science* 10 156–162 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.011>
- Li J Waterhouse R M & Zdobnov E M (2011) A remarkably stable TipE gene cluster: evolution of insect Para sodium channel auxiliary subunits *BMC Evolutionary Biology* 11(1) 337 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-337>
- Li T & Liu N (2010) Inheritance of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* *Journal of Medical Entomology* 47(6) 1127–1134 <https://doi.org/10.1603/ME10142>
- Linss J G Brito L Garcia, G Araki A Bruno R Lima, J B Valle D & Martins A J (2014) Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations *Parasites & Vectors* 7(1) 25 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-25>
- Liu N (2015) Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions *Annual Review of Entomology* 60(1) 537–559 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.010814.020828>
- Liu Z Valles S M & Dong K (2000) Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30(10) 991–997 [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00074-6)
- Maciel de Freitas R & Lourenço de Oliveira R (2011) Does targeting key containers effectively reduce *Aedes aegypti* population density? *Tropical Medicine and International Health* 16(8) 965–973 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02797.x>
- Manjarres Suarez A & Olivero Verbel J (2013) Chemical control of *Aedes aegypti* a

historical perspective *Revista Costarricense de Salud Publica* 22 68–75

- Marcombe S Farajollahi A Healy S P Clark G G & Fonseca, D M (2014) Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved *PLoS ONE* 9(7) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101992>
- Marcombe S Mathieu R B Pocquet N Riaz M A Poupardin R Selior S Darriet, F Reynaud S Yebakima, A Corbel V David J P & Chandre F (2012) Insecticide resistance in the Dengue vector *Aedes aegypti* from martinique Distribution mechanisms and relations with environmental factors *PLoS ONE* 7(2) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030989>
- Martins A J Lima, J B P Peixoto A A & Valle D (2009) Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations *Tropical Medicine and International Health* 14(11) 1351–1355 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02378.x>
- Mayer S V Tesh R B & Vasilakis N (2017) The emergence of arthropod borne viral diseases A global prospective on Dengue chikungunya and zika fevers *Acta Tropica* 166 155–163 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- McGraw E a & O'Neill S L (2013) Beyond insecticides new thinking on an ancient problem *Nature Reviews Microbiology* 11(3) 181–193 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>
- Miller M J & Loaiza, J R (2015) Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama—Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(1) 1–7 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003383>
- MINSA (2015) Boletín Epidemiológico N° 34 Dengue *Ministerio de Salud Departamento de Epidemiología* Republica de Panama
- MINSA (2016a) Boletín Epidemiológico N° 14 Zika *Ministerio de Salud Departamento de Epidemiología*, Republica de Panama
- MINSA (2016b) Boletín Epidemiológico N° 14 Dengue *Ministerio de Salud Departamento de Epidemiología* Republica de Panama
- MINSA (2016c) Boletín Epidemiológico N° 4 Chikungunya *Ministerio de Salud Departamento de Epidemiología* Republica de Panama
- Naqqash M N Gokçe A Bakhsh A & Salim M (2016) Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests *Parasitology Research* 115(4) 1363–1373

<https://doi.org/10.1007/s00436-015-4898-9>

- Narahashi T (1996) Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides *Pharmacology & Toxicology* 18 1–14 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x>
- National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database CID=3036 [Imagen en línea] Recuperada el 25 de marzo 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3036>
- National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database CID=5392 [Imagen en línea] Recuperado el 25 de marzo 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5392>
- National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database CID=276 [Imagen en línea] Recuperado el 25 de marzo 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/276>
- National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database CID=40585 [Imagen en línea] Recuperado el 25 de marzo 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40585>
- OPS (2014) Guías para el abordaje integral del Dengue en Panamá 2014 *Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud* Panamá
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V & Fontenille D (2009) *Aedes albopictus* an arbovirus vector: From the darkness to the light *Microbes and Infection* 11 (14) 1177–1185 <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- Powell J R & Tabachnick W J (2013) History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: A review *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 11–17 <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>
- Ranson H, Burhan J, Lumjuan N & Black IV W C (2010) Insecticide resistance in Dengue vectors *Tropika* 1–12 Retrieved from <http://journal.tropika.net/pdf/tropika/v1n1/a03v1n1.pdf>
- Rey J & Lounibos P (2015) Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades *Biomedica* 35(2) 1–27 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
- Rinkevich F D, Du Y & Dong K (2013) Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106(3) 93–100 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.007>

- Saavedra Rodriguez K Suarez A F Fernandez Salas I Strode C Ranson H Hemingway J & Black IV W C (2012) Transcription of detoxification genes following permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti* *Insect Molecular Biology* 21(1) 61–67 [https://doi.org/doi 10 1111/j 1365 2583 2011 01113 x](https://doi.org/doi%2010%201111/j%201365%202583%202011%201113)
- Saavedra Rodriguez K Urdaneta Marquez L Rajatileka, S Moulton M Flores A E Fernandez Salas I Bisset J Rodriguez M Mccall P J Donnelly M J Ranson H Hemingway J & Black IV W C (2007) A mutation in the voltage gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti* *Insect Molecular Biology* 16(6) 785–798 [https://doi.org/10 1111/j 1365 2583 2007 00774 x](https://doi.org/10%201111/j%201365%202583%202007%2000774)
- San Martin J L & Brathwaite Dick O (2007) Delivery issues related to Vector Control Operations A special focus on the Americas *WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* 1–5
- San Martin J L Brathwaite O Zambrano B Solorzano J O Bouckennooghe A Dayan G H & Guzman M G (2010) The epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades A worrisome reality *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82(1) 128–135 [https://doi.org/10 4269/ajtmh 2010 09 0346](https://doi.org/10%204269/ajtmh%202010%2009%200346)
- Saniyaolu A Okorie C Badaru O Wynveen E Wallace W Akl J Freeze A Kamel A Madonna, M Mathur A Moran R & Perry C (2016) Chikungunya Epidemiology A Global Perspective *SM Journal of Public Health and Epidemiology* 2(2) 1–7
- Scott T W & Takken W (2012) Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission *Trends in Parasitology* 28(3) 114–121 [https://doi.org/10 1016/j pt 2012 01 001](https://doi.org/10%201016/j%20pt%202012%2001%20001)
- Shen H Zhou Q Pan X Li Z Wu J & Yan N (2017) Structure of a eukaryotic voltage gated sodium channel at near atomic resolution *Science* 355(6328) eaal4326 [https://doi.org/10 1126/science aal4326](https://doi.org/10%201126/science%20aal4326)
- Slosek J (1986) *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas a review of their interactions with the human population *Social Science & Medicine* 23(3) 249–257
- Smith L B Kasai S & Scott J G (2016) Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Important mosquito vectors of human diseases *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133 1–12 [https://doi.org/10 1016/j pestbp 2016 03 005](https://doi.org/10%201016/j%20pestbp%202016%2003%20005)
- Smith T J Ingles P J & Soderlund D M (1998) Actions of the pyrethroid insecticides cismethrin and cypermethrin on house fly *Vssc1* sodium channels

- expressed in *Xenopus* oocytes *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 38(3) 126–136
- Soderlund D M (2012) Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances *Archives of Toxicology* 86(2) 165–181
<https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>
- Vais H, Williamson M S, Devonshire A L & Usherwood P N R (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels *Pest Management Science* 57(10) 877–888
<https://doi.org/10.1002/ps.392>
- van den Berg H, Zaim M, Yadav R S, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, Hui J, Dash A P & Ejov M (2012) Global trends in the use of insecticides to control vector borne diseases *Environmental Health Perspectives* 120(4) 577–582
<https://doi.org/10.1289/ehp.1104340>
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A & Ranson H (2012) Insecticide resistance in the major Dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104(2) 126–131
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>
- Wang L, Nomura Y, Du Y & Dong K (2013) Differential effects of TipE and a TipE Homologous Protein on Modulation of Gating Properties of Sodium Channels from *Drosophila melanogaster* *PLoS ONE* 8(7) 1–11
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067551>
- WHO (1957) Expert Committee on Insecticides: Seventh Report *World Health Organization Technical Report Series* 125, Switzerland: Geneva
- WHO (1992) Vector Resistance to Insecticides: 15th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control *World Health Organization Technical Report Series*, Switzerland: Geneva
- WHO (2006) Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance *World Health Organization* 1(6) 125
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01165.x>
- WHO (2011) The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving the effectiveness of modern malaria vector control. Meeting report *World Health Organization*, Geneva
- WHO (2012) Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors *World Health Organization*

- WHO (2014) A global brief on vector borne diseases *World Health Organization*
- WHO (2016) Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations Interim guidance for entomologists *World Health Organization*
- Xu J Bonizzoni M Zhong D Zhou G Cai S Li Y Wang X Lo E Lee R Sheen R Duan J Yan G & Chen X G (2016) Multi country Survey Revealed Prevalent and Novel F1534S Mutation in Voltage Gated Sodium Channel (VGSC) Gene in *Aedes albopictus* *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(5) 1–12 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004696>
- Xu Q Zhang L Li T Zhang L He L Dong K & Liu N (2012) Evolutionary adaptation of the amino acid and codon usage of the mosquito sodium channel following insecticide selection in the field mosquitoes *PLoS ONE* 7(10) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047609>
- Zacharia, J T (2011) Identity physical and chemical properties of pesticides *Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis* 10–14 <https://doi.org/10.5772/701>
- Zlotkin E (1999) The insect voltage gated sodium channel as target of insecticides *Annual Review of Entomology* 44 429–455 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.429>